

Friedrich – Schiller Universität Jena

*Belastungsinduziertes Asthma -
Genexpression asthmarelevanter Gene in
Abhängigkeit von der Belastung und vom
Trainingszustand*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor philosophiae (Dr. phil.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Sozial- und Verhaltenswissenschaften

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: M.A., Antje Peuckert

geboren am: 03.05.1978 in: Weimar

Gutachter

1. _____

2. _____

Tag des Kolloquiums: _____

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Gliederung.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI

1	Einleitung.....	1
1.1	Theoretischer Hintergrund.....	1
1.2	Grundlagen der Genexpression.....	2
1.3	Akute Phase Reaktion	8
1.4	Asthma	11
1.5	Exercise-induced asthma (EIA)	12
1.6	Leukotrien Biosynthese	22
1.7	Hinleitung zur Fragestellung	28
2	Fragestellung.....	30
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Studiendesign.....	34
3.2	Probanden.....	34
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	34
3.2.2	Anthropometrische Daten.....	35
3.3	Gesundheitsbeurteilung und Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit.....	35
3.4	Dauertest.....	39
3.5	Labor	41
3.5.1	Probengewinnung und –verarbeitung	41
3.5.2	Laktatbestimmung.....	42
3.5.3	Sandwich – ELISA zur Bestimmung von CRP	43
3.5.4	Sandwich Chemilumiszenz-Assay zur Bestimmung von IL-6.....	43
3.6	Mikroarray – Technologie	43
3.6.1	Array – Design	43
3.6.2	Der Spottingprozess.....	46
3.6.3	Arbeitsschritte bis zur Hybridisierung des Mitteldichte-Arrays.....	47
3.6.4	Array – Hybridisierung und Waschschrte	59

3.6.5	Scannen des Mitteldichtearrays und Auswertung	62
3.7	Statistische Verfahren	63
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Ergebnisse aus dem Anamnesefragebogen.....	65
4.2	Ergebnisse des Dauertest	66
4.3	Hämatokrit und Blutzellen.....	67
4.4	Humorale Kontrollparameter.....	68
4.4.1	Interleukin 6.....	68
4.4.2	C-reaktives Protein.....	69
4.5	Ergebnisse der Genexpression	70
4.6	Gene der Akuten-Phase-Reaktion.....	77
4.6.1	IL-6 (Interleukin 6)	77
4.6.2	IL-6 R (Interleukin 6 Rezeptor)	78
4.6.3	CRP	78
4.7	Asthmarelevante Gene	79
4.7.1	ALOX5.....	79
4.7.2	ALOX5AP	80
4.7.3	Leukotrien B ₄ Rezeptor (LTBR).....	81
4.7.4	IL-1R1 und IL-1R2 (Interleukin 1 Rezeptor 1 und 2)	82
4.7.5	TNF (Tumor Nekrose Faktor Superfamily, member 2)	83
4.7.6	RANTES (CCL5)	84
4.7.7	IL-8 (Interleukin 8).....	85
4.7.8	IL-2RA/ IL-2RG (Interleukin 2 Rezeptor alpha und gamma)	86
4.7.9	IL-10 RA (Interleukin 10 Rezeptor alpha).....	87
4.7.10	IL-13RA (Interleukin 13 Rezeptor, alpha1).....	88
4.7.11	GM-CSF (Granulozyten – Monozyten Colony-stimulating-factor)	89
4.7.12	Prostaglandin Synthasen 1 und 2 (PTGS1 und PTGS2).....	90
4.7.13	TBXAS1 (Thromboxane A Synthase 1).....	92
4.7.14	MAPK14 (mitogen activated protein kinase 14)	93
4.7.15	HRH1 (Histamin Rezeptor H1)	94
4.7.16	Übersichten, Netzwerke und Signaling zum Eikosanoidstoffwechsel..	95
5	Diskussion	101
5.1	Leistungsphysiologische Voraussetzungen	101
5.2	Ergebnisse des Fragebogens.....	102

Inhaltsverzeichnis

5.3	Veränderungen der Zellkonzentrationen	103
5.4	Belastungs- und trainingsinduzierte Veränderungen der Akuten-Phase-Proteine	105
5.5	Belastungsinduzierte Veränderungen der Genexpression asthmarelevanter Gene.....	108
5.6	Trainingsinduzierte Veränderungen der Genexpression asthmarelevanter Gene.....	125
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	128
7	Literaturverzeichnis	131
8	Anhang	149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung. 1: Schematische Darstellung der Kontrolle der Genexpression.....	3
Abbildung. 2: Biologische Klassifikation der auf den Mikroarrays befindlichen Sonden	6
Abbildung 3: Heute gebräuchliche Klassifikation von Mikroarrays.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung eines Mikroarray-Experimentes.....	8
Abbildung 5: Rolle der inflammatorischen Zellmediatoren der frühen und späten asthmatischen Antwort	17
Abbildung 6: Effekte von LTB ₄ auf die Zellen des Immunsystems.....	25
Abbildung 7: Stufentest auf dem Fahrradergometer	36
Abbildung 8: Bestimmung der Laktatleistungskurve nach Stegmann	37
Abbildung 9: schematische Darstellung des Dauertest	39
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Dauertests	40
Abbildung 11: Klassifikation der eingesetzten Mikroarrays.....	44
Abbildung 12: a) Vergrößerte Ansicht der Pinhalterung des 48er Pinsets; b) Vergrößerter Spotting Pin mit seitlichem Spalt	46
Abbildung 13: Spottingverfahren.	47
Abbildung 14: detaillierter Ablauf des Mikro-Array Experiments	48
Abbildung 15: Ergebnis der Elektrophorese	50
Abbildung 16: Peaks und ribosomale Banden aus der Elektrophorese	51
Abbildung 17: Reverse Transkription und gleichzeitige Modifizierung	53
Abbildung 18: DY-548-NHS.....	56
Abbildung 19: DY-648-NHS.....	56
Abbildung 20: Reaktion der NHS-Ester mit den Farbstoffen.....	57
Abbildung 21: Reaktion der Spikes mit den Fluoreszenzfarbstoffen.....	57
Abbildung 22: Scanbild des GenePix (4000B).....	62
Abbildung 23: Veränderung der Interleukin 6 Konzentration	69
Abbildung 24: Veränderung der CRP – Konzentration	70
Abbildung 25: Bildliche Darstellung der Clusteranalyse von Genen, die in Abhängigkeit von der Belastung signifikant reguliert wurden.....	71
Abbildung 26: Bildliche Darstellung der Clusteranalyse von Genen, die in Abhängigkeit vom Trainingszustand signifikant reguliert wurden	72

Abbildung 27: Veränderung der Genexpression von IL-6	77
Abbildung 28: Veränderung der Genexpression von IL-6R	78
Abbildung 29: Veränderung der Genexpression von CRP	79
Abbildung 30: Veränderung der Genexpression von ALOX5.....	80
Abbildung 31: Veränderung der Genexpression von ALOX5AP.....	81
Abbildung 32: Veränderung der Genexpression des LTB ₄ Rezeptors	82
Abbildung 33: Veränderung der Genexpression von IL-1R1	83
Abbildung 34: Veränderung der Genexpression von IL-1R2	83
Abbildung 35: Veränderung der Genexpression von TNF-α.....	84
Abbildung 36: Veränderung der Genexpression von RANTES (CCL5)	85
Abbildung 37: Veränderung der Genexpression von Interleukin 8.....	86
Abbildung 38: Veränderung der Genexpression von IL-2RA	87
Abbildung 39: Veränderung der Genexpression von IL-2RG.....	87
Abbildung 40: Veränderung der Genexpression von IL-10RA.....	88
Abbildung 41: Veränderung der Genexpression von IL-13RG.....	89
Abbildung 42: Veränderung der Genexpression von GM-CSF	90
Abbildung 43: Veränderung der Genexpression von PTGS1	91
Abbildung 44: Veränderung der Genexpression von PTGS2	92
Abbildung 45: Veränderung der Genexpression von TBXAS1	93
Abbildung 46: Veränderung der Genexpression von MAPK14.....	94
Abbildung 47: Veränderung der Genexpression von HRH1	95
Abbildung 48: Cyclooxygenase- und Lipoxigenasestoffwechselweg und belastungsinduzierte Veränderungen	96
Abbildung 49: Genexpression nach körperlicher Belastung	97
Abbildung 50: Aktivierung der 5-LO.....	99
Abbildung 51: eingesetzter Fragebogen.....	167

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Mediatoren des Asthmas	21
Tabelle 2: Anthropometrische Daten der Probanden.....	35
Tabelle 3: Darstellung der leistungsdagnostischen Daten der trainierten und untrainierten Probanden, sowie der Gesamtpopulation.....	38
Tabelle 4: Standardisierte Reihenfolge der Blutabnahmen, Art der Monovetten und Verwendungszweck	41
Tabelle 5: Ansatz Alien Spike Mix	54
Tabelle 6: Pipettieransatz für die Proben, Kontrollen und Spikes für die cDNA- Synthese	54
Tabelle 7: Die Hybridisierungslösung für eine Probe	58
Tabelle 8: Zusammensetzung der Hybridisierungslösung	
und der Waschlösungen.....	60
Tabelle 9: Das Programm der standardisierten und kontrollieren	
Hybridisierung am Tecan Gerät.....	61
Tabelle 10: Ergebnisse aus dem Dauertest.....	66
Tabelle 11: Darstellung der Immunparameter vor, direkt nach, 45min nach und 2 Stunden nach der Belastung.....	68
Tabelle 12: exemplarischer Auszug aus der Genliste der Gene, die sich infolge der Belastung signifikant verändert haben	74
Tabelle 13: exemplarischer Auszug aus der Genliste der Gene, die sich in Abhängigkeit vom Trainingszustand signifikant verändert haben.	75
Tabelle 14: Gene aus der Genliste, die sich sowohl in Abhängigkeit vom Trainingszustand, als auch von der Belastung verändert haben.	76
Tabelle 15: Einzelwerte der anthropometrischen Daten	149
Tabelle 16: Einzelwerte der Leistungsdaten	150
Tabelle 17: Einzelwerte aus dem Dauertest	151
Tabelle 18: Einzelwerte der Herzfrequenzen (HF) während des Dauertests	152
Tabelle 19: Blutdruckwerte in mmHg während des Dauertests	153
Tabelle 20: Laktatwerte (Lac) in mmol/l während des Dauertests	154
Tabelle 21: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt A	155
Tabelle 22: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt A	156
Tabelle 23: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt B	157

Tabelle 24: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt B	158
Tabelle 25: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt C.....	159
Tabelle 26: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt C.....	160
Tabelle 27: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt D.....	161
Tabelle 28: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt D.....	162
Tabelle 29: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von ALOX5AP,	
ALOX5 und CSF2 (GM-CSF)	163
Tabelle 30: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von Histamin-Rezeptor H1	
(HRH1), Prostaglandinsynthase 1 und 2 (PTGS1/2)	
und Thromboxan Synthase 1 (TBXAS1);	164
Tabelle 31: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von IL-10 RA, IL-13RA1,	
IL-1R1 und R2;	165
Tabelle 32: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von IL2RA und RG und IL-8;	166

Abkürzungsverzeichnis

5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetrasäure
5-LO	5-Lipoxygenase
AA	Arachidonsäure
ALOX5	Arachidon Lipoxygenase 5
ALOX5AP	Arachidon Lipoxygenase 5 aktivierendes Protein
ASS	Acetylsalicylsäure (z.B. in Aspirin)
BLT1 und BLT2	Rezeptoren für LTB ₄
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CK	Creatinkinase
COX1 bzw. COX2	Cyclooxygenase 1 bzw. 2
CRP	C- reaktives Proteins
CysLT	Cysteinyl – Leukotriene
CysLT1 und CysLT2	Rezeptoren der Cysteinyl – Leukotriene
Da	Dalton
DUSP	dual-specificity phosphatase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Exercise-induced asthma
EIB	Exercise-induced bronchoconstriction
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GGT	Gamma- Glytanyl- Transferase
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor
GOT	Glutamyl- Oxalacetat- Transferase
GPCRs	G-Protein-gebundene-Rezeptoren
GPT	Glutamyl- Phenylalanin- Transferase
hnRNA	hochmolekulare nukleäre RNA
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschock Protein)
IAS	Individuelle Anaerobe Schwelle
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobuline

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LT	Leukotriene
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
MK	MAPKinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor – kappa B
PAF	Plättchen Aktivierender Faktor
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PGHS	Prostaglandin H Synthase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription – PolymeraseChainReaction
SD	Standardabweichung
TBX	Thromboxan
TBXAS ₂	Thromboxan A ₂
TH	T-Helferzelle
TF	Transkriptionsfaktor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
tRNA	Tranfer-RNA
VO ₂ max	maximale Sauerstoffaufnahme

1 Einleitung

1.1 Theoretischer Hintergrund

Anstrengende Ausdauerbelastungen führen, je nach Intensität und Dauer der Belastung, zu einer Akut-Phase-Reaktion, welche mit dem Anstieg der Blutkonzentration verschiedener Akut-Phase-Proteine wie CRP, Haptoglobin, Fibrinogen u.a. verbunden ist. Die zugrunde liegende Überexpression dieser Proteine im Leberparenchym steht unter der inflammatorischen Kontrolle verschiedener Mediatoren. Viele Studien haben daher auch eine belastungsinduzierte Veränderung sowohl von pro- als auch anti-inflammatorischen Mediatoren (z.B. IL-1, TNF- α , IL-6 oder IL-10) nachweisen können (Fielding, Manfredi et al., 1993; Moldoveanu, Shephard & Shek, 2000; Northoff, Weinstock & Berg, 1994; Pedersen, Ostrowski, Rohde & Bruunsgaard, 1998; Pedersen, Steensberg & Schjerling, 2001; Starkie, R. L., Rolland, Angus, Anderson & Febbraio, 2001; Steensberg, Fischer, Keller, Moller & Pedersen, 2003; Ullum, Haahr et al., 1994; Weinstock, König et al., 1997). Im Gegensatz zu den gut belegten Veränderungen dieser Parameter im Plasma, ist jedoch nur wenig über die Regulation und Genexpression dieser immunologisch aktiven Mediatoren in zirkulierenden Leukozyten nach Stressbelastung bekannt.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Studie, die belastungsinduzierte Akute-Phase-Reaktion auf Genexpressionsebene zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die, auch für den Leistungssport bedeutsame, pathologische Reaktion des Bronchialapparates, dem belastungsinduzierten Asthma bronchiale (EIA – Exercise-induced asthma), gelegt.

Da die Stärke der immunologischen Reaktion von der Dauer, Intensität und Art der körperlichen Belastung abhängig ist, war es unsere Hypothese, dass dies auch für die zugrunde liegende Genexpression in zirkulierenden Leukozyten der Fall ist. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie die gewählte Belastung durch Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) (Stegmann, Kindermann & Schnabel, 1981) standardisiert und gesteuert. Dabei wurden die Probanden 90 Minuten bei 80% der IAS auf einem Fahrradergometer belastet. Dieses Modell zur Belastungssteuerung entspricht dem aktuellen Stand der Wissenschaft und hat sich schon in anderen Studien für die Untersuchung von immunologischen

Veränderungen nach physischen Belastungen bewährt (Gabriel, Schwarz, Steffens & Kindermann, 1992).

Für die Untersuchungen auf molekularer Ebene können seit wenigen Jahren neue hochsensitive, multiparametrische Analyseverfahren verwendet werden. Solche Mikroarray-Analysen erlauben die gleichzeitige Bestimmung der mRNA – Expression von einigen hundert bis tausend Genen (Fehrenbach, Zieker et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde diese Technik eingesetzt, um die immunologische Regulation von inflammatorisch bedeutsamen Genen nach der standardisierten Ausdauerbelastung zu untersuchen.

Auch und vor allem pathologische Zustände führen häufig zu einer veränderten Expression inflammatorischer Mediatoren. Dabei fällt es bei der Vielzahl von Veränderungen aber schwer, die vorhandenen Abläufe korrekt zu beschreiben. Ein standardisierter Test in Verbindung mit einer umfassenden Untersuchung von Transkriptionsvorgängen bietet damit nicht nur die Möglichkeit einer Aufdeckung von physiologischen molekularen Mechanismen und Abläufen, sondern hilft auch bei der Untersuchung von pathologischen Zuständen und klinischen Symptomen, wie bei allergischen Reaktionen oder wie hier im Speziellen dem Exercise-induced asthma (EIA).

1.2 Grundlagen der Genexpression

Die Genexpression verläuft in mehreren Schritten, wobei zunächst die genetische Information der DNA in die Bausteinreihenfolge der mRNA übertragen wird (Transkription). Anschliessend wird diese Information bei der Eiweißsynthese für die Synthese eines Proteins genutzt (Translation).

Schritte der Genexpression:

- Initiation der Transkription
- Termination der Transkription
- Spleißen
- Transport ins Zytoplasma
- Initiation der Translation
- Stabilität der mRNA im Zytoplasma

Im Weiteren sollen Begrifflichkeiten erklärt und hinführend Grundlagen zur Mikroarraytechnik erläutert werden.

Die Kontrolle der *Genexpression* stützt sich auf ein feines Netzwerk, an dem verschiedene Faktoren, wie diverse Proteine, Nukleinsäuren, und andere intra- oder extrazelluläre Faktoren (z.B. Hormone, Kalzium – Ionen) sowie Umwelteinflüsse beteiligt sind (Müller & Röder, 2004).

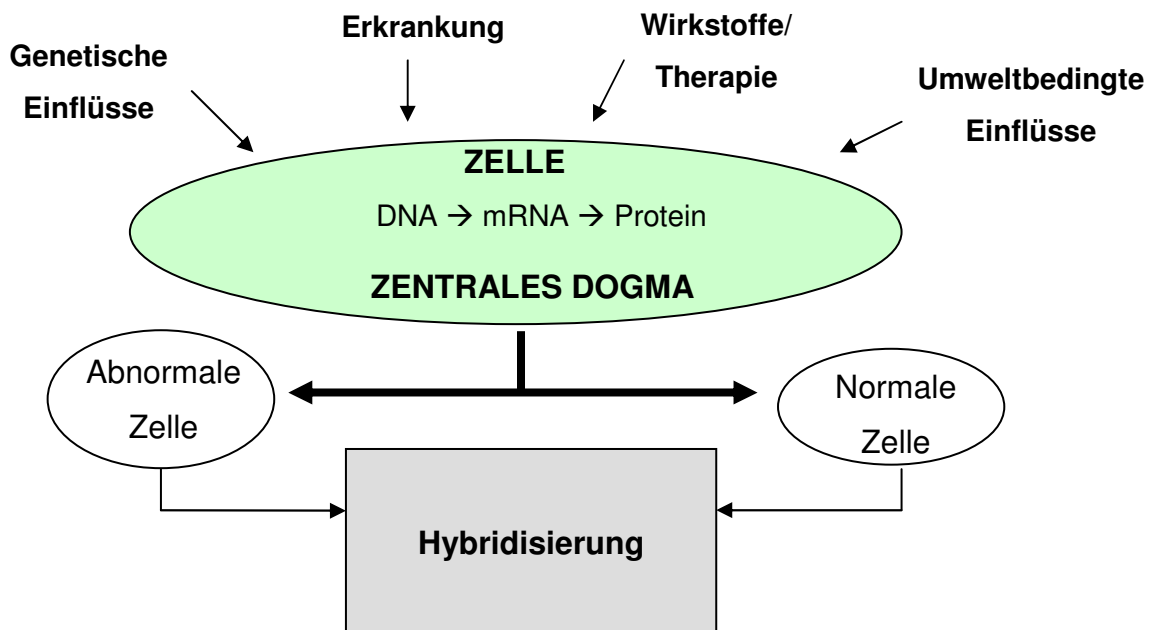


Abbildung. 1: Schematische Darstellung der Kontrolle der Genexpression.

Die *Desoxyribonukleinsäure (DNA)* ist ein langes Polymer, das aus einer Kette von Einzelbausteinen aufgebaut ist, die man Desoxyribonukleotide nennt.

Die in der DNA vorliegenden Basenpaare werden von den jeweils komplementären Basen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin gebildet. Zwischen Adenin und Thymin bilden sich dabei zwei Wasserstoffbrücken aus; Cytosin und Guanin sind über drei Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft. Jeweils drei solcher Basen, wie sie in einem DNA-Einzelstrang direkt hintereinander liegen, bilden ein so genanntes Basentriplett. Jedes Basentriplett steht für eine von 20 Aminosäuren, aus denen die Proteine aufgebaut sind. Die Basenabfolge (Basensequenz) eines Genabschnitts der DNA wird bei der Proteinsynthese zunächst durch die Transkription in die komplementäre Basensequenz eines so genannten Messenger-Ribonukleinsäure-Moleküls, abgekürzt mRNA, überschrieben.

Die *RNA* enthält, im Unterschied zur *DNA*, Ribose anstelle von Desoxyribose und die Base Uracil anstelle von Thymin. Die *mRNA* ist eine direkte *RNA*-Kopie eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der *DNA*. Die von der *mRNA* übermittelte Information wird dann durch Translation an einem Ribosom in die Abfolge der Aminosäuren (Aminosäuresequenz) einer Polypeptidkette übersetzt.

Die Überschreibung der genetischen Information der *DNA* in *RNA* bezeichnet man als *Transkription*, dies ist der erste Schritt der Proteinbiosynthese.

Durch *RNA*-Polymerasen werden die Wasserstoffbindungen des im Zellkern enthaltenen *DNA*-Doppelstrangs in einem kurzen Stück zu zwei Einzelsträngen aufgelöst. Die Basenfolge wird auf einen Einzelstrang übertragen und es entsteht eine Messenger-*RNA* (*mRNA*). Die im ersten Teil entstandene *RNA* wird auch als unreife *RNA* (*hnRNA* = hochmolekulare nukleare *RNA*) bezeichnet und wird nachträglich durch Splicing, Capping und Anlagerung eines Poly-A-Schwanzes noch modifiziert. Als reife *RNA* verlässt sie dann durch eine Kernpore den Zellkern und gelangt zu den Ribosomen.

Als *Translation* wird dann der Vorgang in der Zelle bezeichnet, bei dem aus einer in Abfolge von Nukleotiden codierten Information ein Protein hergestellt wird. Sie ist damit der letzte Schritt der Eiweißsynthese, bei dem anhand des genetischen Codes aus Erbinformationen ein Eiweißmolekül entsteht. Dieser Prozess passiert an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums. Durch Anlagerung spezifischer Aminosäuren der so genannten Transfer-*RNA* (*tRNA*) an die entstandene *mRNA* wird die zwischengespeicherte genetische Information auf der *mRNA* am Ribosom abgelesen und es entsteht ein Protein mit einer bestimmten Aminosäuresequenz.

Bisher wurden nur vereinzelte Studien zu den biologischen Grundlagen der belastungsinduzierten Immunreaktion auf Genexpressionsebene durchgeführt. In einigen Untersuchungen (Ostrowski, Rohde, Zacho, Asp & Pedersen, 1998) wurden durch Muskelbiopsien oder Isolation von einzelnen Immunzellen aus dem peripheren Blut *in vitro* Interleukine mit herkömmlichen Methoden isoliert und die Menge der *mRNA* gemessen oder dargestellt (RT – PCR, Northern Plotting). Des Weiteren existieren wenige Studien zu Genexpressionsveränderung durch sportliche Belastung in Blutleukozyten (Zieker, Fehrenbach et al., 2005; Zieker, Zieker et al., 2005).

Signaltransduktion

Mediatoren, die von Zellen sezerniert werden und zahlreiche biologische Funktionen zwischen Zellen verursachen werden als Zytokine bezeichnet. Damit eine Zelle auf Zytokine reagieren kann, ist das Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Nöten. Des Weiteren ist die Zugänglichkeit des Rezeptors für den Effektor von großer Bedeutung. Entscheidend ist dabei die Anzahl der Rezeptoren, wie auch die Lokalisation, um die Stimulierbarkeit der Zelle zu gewährleisten (Löffler, Petrides & Löffler, 2003).

Viele Zytokine wirken über Rezeptorkomplexe, in denen Liganden-bindende Untereinheiten mit Signal-transduzierenden Untereinheiten assoziiert sind (Löffler et al., 2003).

Diese Signaltransduktionsereignisse ermöglichen letztendlich die Anpassung der Zelle an die aktuellen Bedingungen und Bedürfnisse durch Regulation der Zellgestalt und Zellbewegung, des Metabolismus sowie der allen Vorgängen zugrunde liegenden Genexpression.

Mikroarray Technik

Neben den herkömmlichen Labormethoden war es durch eine Kooperation des Lehrstuhls für Sportmedizin Jena mit der SIRS-Lab GmbH in Jena möglich, ein gentechnologisches Verfahren zur Aufdeckung von Inflammations- und Immunreaktionsprozessen, wie die Mikroarraytechnik einzusetzen.

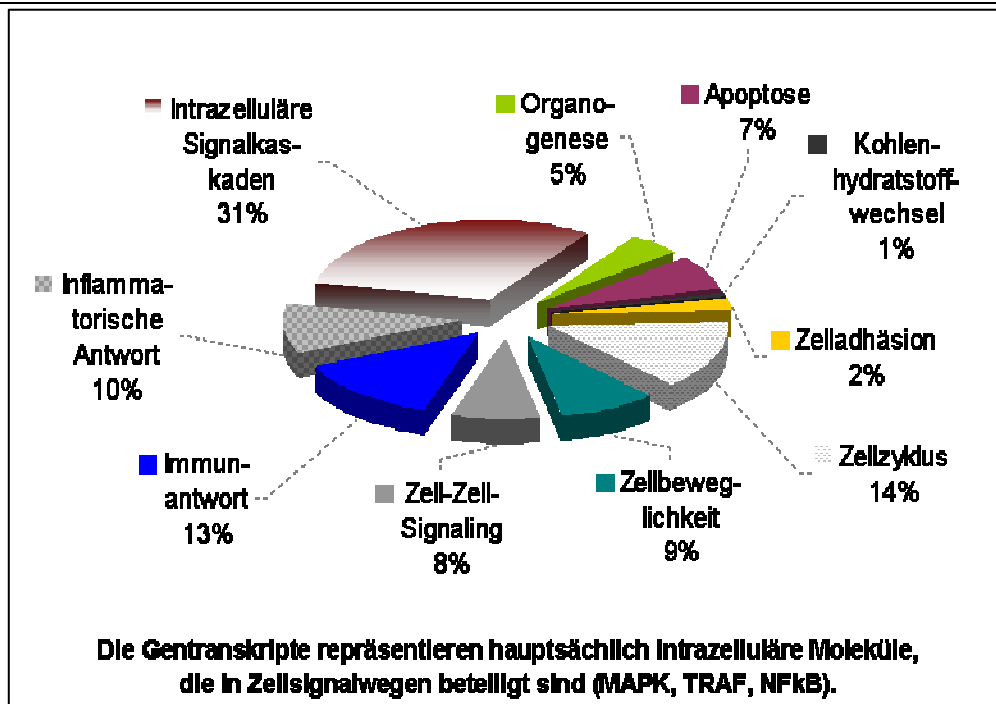


Abbildung. 2: Biologische Klassifikation der auf den Mikroarrays befindlichen Sonden (SIRS Lab GmbH)

Die Mikroarray Technik ist eine sehr junge Technologie, mit der es seit Ende der 1990er Jahre möglich ist die Zusammensetzung und relative Menge der mRNA in einer Zelle zu „messen“. Wegen der hohen Anzahl an Tests pro Zeiteinheit, der vergleichsweise geringen Probenmenge und der guten Automatisierbarkeit hat sie sich rasch als wichtiger Bestandteil in der Forschung für verschiedene Bereiche der Pharmazie, Medizin, Biochemie, Genetik und Mikrobiologie durchgesetzt.

Die verwendeten Biochips, synonym auch Mikroarrays genannt, bestehen aus einer Glasscheibe, Silizium oder Kunststoff ungefähr von der Größe eines Daumennagels, die bis zu 100.000 mikroskopisch kleine, verschiedene Punkte („Spots“) enthält. Auf Grund ihrer geringen Größe wird die Anordnung (engl. „array“) der einzelnen Spots auch als „Mikro-Array“ bezeichnet. In jedem einzelnen Spot des Mikroarrays trägt man zahlreiche Kopien eines eindeutig bestimmten DNA-Abschnitts (Gens) von Interesse auf den Trägerchip auf, die als Andockstellen für die mRNA-Moleküle dienen.

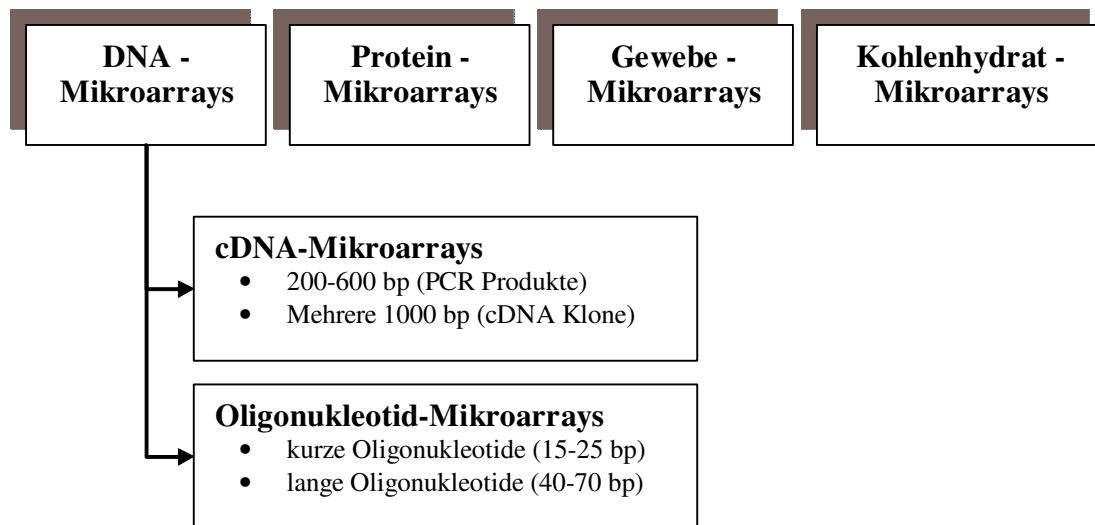


Abbildung 3: Heute gebräuchliche Klassifikation von Mikroarrays (nach Choudhuri (2004))

Die derzeit in der Forschung am meisten angewendetsten Mikroarrays sind die DNA-Mikroarrays. Man kann die DNA-Mikroarrays in zwei Haupttypen gliedern: cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays (siehe Abbildung 3) (Chaudhuri, 2005). Anhand der Länge ihrer Sonden werden Oligonukleotid-Mikroarrays außerdem weiter in kurze (12-25 bp) und lange (40-70 bp) Oligonukleotid-Mikroarrays eingeteilt (Hacia, 1999). Die DNA-Array-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren (Watson Crick-Base-Pairing). Aus den mRNA-Molekülen werden mit Hilfe der Reversen Transkriptase¹ DNA-Moleküle (copyDNA=cDNA) hergestellt, die bei der Hybridisierungsmethode eingesetzt werden. Dabei lagern sich zwei komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen, um den Wasserkontakt zu minimieren. Das Prinzip mit markierten Nukleinsäuren andere Nukleinsäure zu analysieren nutzte erstmals Ed Southern (Southern Blot). Mittels eines Scanners wird die Intensität der fluoreszierenden Lösung und damit die Menge an zu hybridisierender mRNA für jeden Punkt des Mikroarrays gemessen. Die reskalierte Lichtintensität wird als Genexpression oder auch Genaktivität bezeichnet. In dieser Studie wurden die Expressionen von mehr als 5000 Genen vor der Belastung mit den Veränderungen der Genexpression 45 Minuten nach der Belastung verglichen.

¹ Reverse Transkriptase: Enzyme, die die Umschreibung von RNA in DNA katalysieren

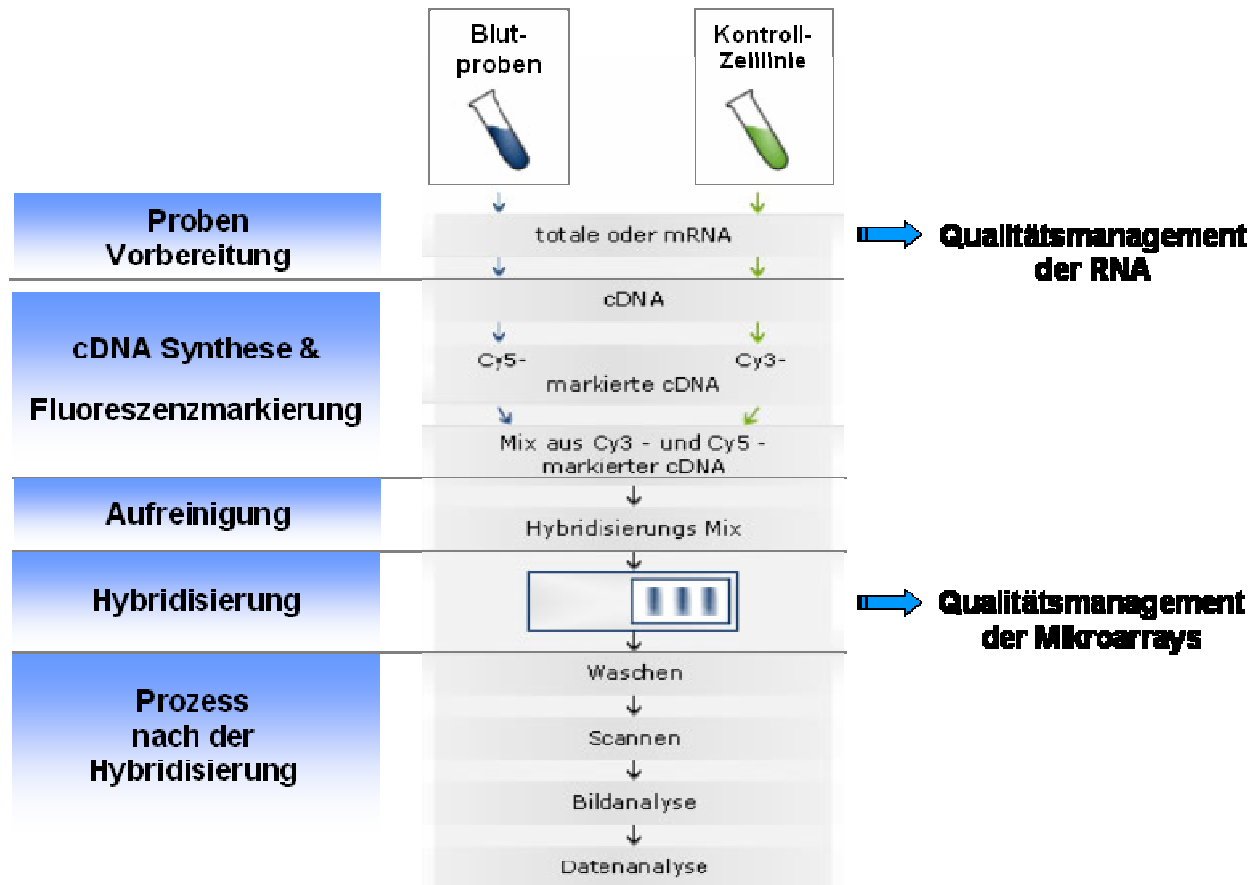


Abbildung 4: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung eines Mikroarray-Experimentes.

1.3 Akute Phase Reaktion

Durch sportliche Belastung, insbesondere bei anaeroben Intervallbelastungen mit einer hohen exzentrischen Komponente, jedoch auch bei langandauernden aeroben Ausdauerbelastungen z.B. Marathonlauf (Pedersen et al., 2001) kommt es zu Schädigungen im Gewebe, die zu einer akuten Entzündungsreaktion führen können. Diese Gewebeschädigungen, die durch Traumata, Verletzungen oder Infektionen hervorgerufen werden, führen zu einer Vielzahl von systemischen, metabolischen Veränderungen, die global als Akute-Phase-Reaktion verstanden werden (Gabriel, Müller & Kindermann, 2000). Als Folge dieser Entzündungsreaktion kommt es zu einer rapiden Erhöhung von bestimmten Proteinen im Serum, mit dem Ziel vor einer fortschreitenden Gewebszerstörung zu schützen, infektiöse Organismen zu zerstören und Reparaturprozesse zu initiieren. Man bezeichnet diese Proteine als Akut-Phase-Proteine. Das wichtigste Protein ist dabei das C-reaktive Protein (CRP), welches im

akuten Entzündungsfall auf das Hundert- bis Tausendfache ansteigen kann. CRP wirkt dabei als Oponin und aktiviert die Kaskade des Komplementsystems und anderer Entzündungsaktivatoren (Gmünder, 2000).

Akut-Phase-Proteine (APP) werden überwiegend in der Leber produziert und regulieren die Immunantwort und hemmen den Entzündungsprozess. Eine Einteilung der APP in zwei Gruppen ist entsprechend ihrer Funktion möglich. Man unterscheidet dabei pro-inflammatorische Proteine (CRP, Komplement-Faktoren, Plasminogen, Kallikrein, Gerinnungsfaktoren), inhibitorische Proteine (α 1-Antitrypsin, α 1-Antichymotrypsin), immunmodulatorische Proteine (saures α 1-Glykoprotein) und Reparatur- und Rückbildungsproteine (α 1-Antitrypsin, α 1-Antichymotrypsin, saures α 1-Glykoprotein, CRP, Haptoglobin) (Gabriel, 2000). Diese Zytokine werden in erster Linie durch die Makrophagen an der Entzündungsstelle freigesetzt, aber auch durch T-Zellen, Fibroblasten, Endo- und Epithelzellen. Neben der Freisetzung der APP kann durch eine gesteigerte Transkriptionsrate eine erhöhte Genexpression der entsprechenden Gene der Zytokine beobachtet werden.

Die wichtigsten dieser Zytokine sind:

- Interleukin 1 (IL-1)
- Interleukin 6 (IL-6)
- Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Nachdem der Metabolismus der Leber angeregt wurde und die Ausschüttung von APP initiiert wurde, erfolgt die Stimulation der Hypophyse mit anschließender Sekretion von ACTH und als Folge dessen auch von Cortisol aus der Nebennierenrinde. Daraus resultiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus, da Kortikosteroide die Genexpression zur Bildung von Zytokinen hemmen. Gleichzeitig existieren synergistische Effekte zwischen Cortisol und IL-1 bzw. IL-6, die zu einer Produktion bestimmter APP führen (Baumann & Gauldie, 1994). Akute Phase Proteine können in 2 Klassen unterteilt werden: Typ-1 APPs und Typ-2 APPs. IL-6 stimuliert die Genexpression von Typ-1 APPs, IL-1 dagegen die der Typ-2 APPs. Die Genexpression von Typ-2 APPs durch IL-1 kann erhöht werden durch einen synergistischen Effekt von IL-6 (Baumann & Gauldie, 1994). Demgegenüber hat IL-1 keine unterstützende Wirkung auf die Expression von Typ-1 APPs.

Regulation der APP

Die Mediatoren der Akuten-Phase-Reaktion lassen sich in vier große Gruppen einteilen:

- (1) IL-6-type Zytokine (IL-6, IL-11, LIF, u.a.)
- (2) IL-1-type Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und TNF- β)
- (3) Glukokortikoide
- (4) Wachstumsfaktoren (Insulin, HGF, FGF, und TGF- β)

Die Zytokine agieren als erste Stimulatoren der Genexpression der APP, während die Glukokortikoide und die Wachstumsfaktoren mehr als Modulatoren der Zytokinaktivität fungieren (Baumann & Gauldie, 1994). Glukokortikoide sind in der Lage die Expression einiger APP direkt zu stimulieren. Die Hauptaufgabe der Glukokortikoide ist es jedoch die Effekte von IL-2 und IL-6-type Zytokinen synergistisch zu einigen APP zu erhöhen (Baumann & Gauldie, 1994). Es wird angenommen, dass eine indirekte Wirkung auf die Glukokortikoide durch den steroid-stimulierten Anstieg bei der Expression des 80kDa IL-6 Rezeptors (IL-6R) hervorgerufen wird (Baumann, Morella & Campos, 1993; Rose-John, Schoolnik et al., 1990).

Die Mediatoren TGF- β IGF, HGF und Insulin haben das Potential die Leber Antwort auf IL-1- und IL-6-type Zytokine zu modulieren.

Insulin beeinflusst die IL-1- und IL-6-type Zytokin Stimulation der meisten menschlichen APP-Gene. Im Gegensatz dazu, während eine IL-1 Stimulation unterdrückt wird, erhöht TGF- β die Effekte von IL-6 auf Typ-2 APP, möglicherweise durch die Expression von IL-6R.

Interleukin 6 wurde ursprünglich als pro-inflammatorisches Zytokin identifiziert, vermutlich, weil es vorrangig in der frühen Phase einer Infektion ansteigt. Nach neueren Erkenntnissen wird IL-6 jedoch als anti-inflammatorisches Zytokin bezeichnet. IL-6 hemmt nämlich die TNF- α Produktion (Steensberg, Keller et al., 2002).

Hohe Plasmakonzentrationen von IL-6 führen zu einer Expression des IL-1Ra (Rezeptor-Antagonisten) – ein Zytokin, dass als Antagonist zu den Effekten des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 wirkt.

Steensberg et al. (2003) wiesen in einer experimentellen Studie nach, dass es nach einer Erhöhung des IL-6 Plasma-Levels zu einem deutlichen Anstieg zweier anti-

inflammatorischer Zytokine IL-1Ra und IL-10 kommt und der Grund für den geringeren Anstieg von CRP im Plasma ist.

C-reaktives Protein (CRP) gehört ebenfalls zu den APPs und wird vorrangig für die Diagnostik bei Entzündungsprozessen herangezogen. Es zählt zu den Opsoninen, welche das Komplementsystem aktivieren. Die Produktion von CRP in der Leber wird in erster Linie durch die Ausschüttung von IL-6 hervorgerufen. Bei gesunden jungen Erwachsenen liegt die mittlere Konzentration der CRP Werte um 0,8 mg/l. Nach einer Akuten-Phase Stimulierung kann es zu einem Anstieg von weniger als 50 µl/l bis zu 500 mg/l kommen, das entspricht einer 10.000fachen Steigerung. Die Halbwertszeit von CRP im Plasma beträgt sowohl bei Gesunden, als auch bei Erkrankung 19 Stunden.

Die beiden Parameter der Akuten-Phase-Reaktion wurden in der vorliegenden Studie mittels ELISA als Kontrollparameter im Plasma bestimmt.

1.4 Asthma

Asthma wird klinisch als eine chronische Entzündung der Atemwege definiert (Sheffer, Bousquet et al., 1992). Die Ursache ist eine Überreaktion des Immunsystems auf bestimmte Reize, infolge dessen es zu einer Verengung der Bronchien kommt und Atemnot entsteht.

Asthma zählt zu den am meisten vorkommenden Kinderkrankheiten in den Entwicklungsländern. Im weltweiten Vergleich der ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) wurde nachgewiesen, dass das Vorkommen von Asthma innerhalb eines Landes, aber auch zwischen verschiedenen Ländern stark variiert. Während in Albanien, China, Griechenland, Georgien, Indonesien, Rumänien und Russland nur etwa 2,1%-4,4% an Asthma erkrankt sind, sind es in Australien, Neuseeland, Irland oder UK zwischen 29,1% und 32,2% der Bevölkerung (Nystad, 2000).

Es ist inzwischen gut bekannt, dass die Familiengeschichte in Bezug auf allergische Erkrankungen zu untersuchen ist. Es wurde eine Reihe von Kandidatengenen aufgedeckt, die beim Menschen eine Prädisposition für die Entwicklung dieser Krankheit bedeuten. Außerdem scheint es Zusammenhänge zwischen dem Geschlecht und dem Auftreten von Asthma zu geben. Im Kindesalter leiden Jungen eher unter Asthma als Mädchen, aufgrund der kleineren Atemwege in Relation zu ihrer Lungengröße. Während der Pubertät und ab dem Alter von 20 Jahren ist das

Risiko an Asthma zu erkranken allerdings dann bei Frauen größer als bei Männern (Nystad, 2000).

Um die Zunahme der Asthmafälle zu erklären, steht u.a. die Identifizierung von bestimmten Risikofaktoren im Mittelpunkt des Interesses. So wird eine Zunahme der Prävalenz von Asthma auch mit verschiedenen Entwicklungsaspekten begründet. Beispielsweise werden eine Verbesserung der allgemeinen Gesundheit, der Körperhygiene, Veränderung der Ernährungsgewohnheiten und eine Verringerung der Familiengröße als Gründe zur verstärkten Entwicklung von Asthmaerkrankung angesehen.

Bei den betroffenen Personen führt die Entzündung der Atemwege zu verschiedenen Symptomen und einer damit verbundenen erhöhten Reaktivität der Atemwege hervorgerufen durch verschiedene Stimuli (Sheffer et al., 1992). Die Mechanismen, die zu einer Behinderung der Atemwege führen sind: Bronchokonstriktion, aufgrund der Kontraktion der glatten Atemmuskulatur, Mukosalödeme, infolge auslaufender Flüssigkeiten aus dem vaskulären Raum, erhöhte Sekretion von Mukus und das Einströmen eosinophiler inflammatorischer Zellen in das Gewebe (O'Byrne, 1997). Mikroskopisch ist Asthma charakterisiert über eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen, Neutrophilen, Lymphozyten und Plasmazellen im Bronchialgewebe und zusätzlicher Bronchial- und Mukussekretion.

1.5 Exercise-induced asthma (EIA)

Definition

Belastungsinduziertes Asthma oder im angloamerikanischen Sprachgebrauch auch als Exercise-induced asthma (EIA) oder Exercise-induced bronchoconstriction (EIB) bezeichnet, ist eine temporäre Erkrankung der Atemwege (Anderson & Daviskas, 2000; Anderson & Holzer, 2000; Anderson & Kippelen, 2005; Cummiskey, 2001; Farooque & Lee, 2003; Giesbrecht & Younes, 1995; Hansen-Flaschen & Schotland, 1998; Helms, 2005; Hendrickson, Lynch & Gleeson, 1994; Hermansen, 2004)

In der Literatur wird häufig zwischen EIA und EIB unterschieden, allerdings werden die Begriffe häufig auch synonym verwendet. Genau genommen definiert EIA einen belastungsbedingten inflammatorischen Zustand, während EIB eine bronchospastische Krankheit ist, die keine inflammatorische Basis hat (Hermansen, 2004). Im Allgemeinen wird EIA als übertriebene Atemwegsantwort auf eine

Dehydrierung der Atemwege durch die Präsenz von inflammatorischen Zellen und ihrer Mediatoren definiert. Die Verengung der Atemwege wird dabei in erster Linie durch die Kontraktion der glatten Muskulatur hervorgerufen. Bei Leistungssportlern und Gesunden sind physiologische Reaktionen und pathologische Veränderungen der Atemwegszellen durch Wärme- und Wasseraustausch der Grund für die Verengung der Atemwege (Anderson & Daviskas, 2000; Anderson & Holzer, 2000; Anderson & Kippelen, 2005; Hansen-Flaschen & Schotland, 1998; Hendrickson et al., 1994). Als messbares Kriterium zur Beschreibung des EIA wird die FEV₁ eingesetzt. Rundell et al. (2000) definieren bei Leistungssportlern EIA über eine 10%ige Abnahme der FEV₁ unmittelbar nach einer Belastung.

Geschichte

Henry Hade Slater kommentierte (1864) als Erster die Entwicklung des Asthmas und er bemerkte, dass nach anstrengendem Laufen oder Rennen bei Wind an einem sehr kalten Wintertag Anzeichen von Asthma entstehen können. Mc Fadden, ein Wegbereiter in der Asthmaforschung, verfasste bereits 1977 heute noch häufig angewendete Theorien, zur Erklärung von EIA (McFadden & Gilbert, 1994). Er bemerkte vor allem, dass insbesondere die Effekte eines Wärme- oder Wasseraustausches in den Atemwegen zu EIA führen (Cummiskey, 2001).

Pathologie

Ungefähr 80% der Asthmatiker und 40% der Patienten mit allergischer Nasenschleimhautentzündung leiden an EIA; 9% der Patienten mit EIA haben keinerlei Asthma oder Allergien (Mellion & Kobayashi, 1992; Spector, 1993).

Bei Leistungssportlern stellen hochintensive Belastungen einen Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma dar. Einige cross-over Studien zeigten eine hohe Prävalenz von Asthma und erhöhter bronchialer Reaktivität bei Top-Athleten (Nystad, 2000; Weiler, 1996). So konnte gezeigt werden, dass 10-15% der Olympiateilnehmer an EIA leiden (Storms, 1999). Über 50% der Kaltwetter-Athleten haben respiratorische Symptome nach Belastung und einen Abfall des FEV₁, der dem bei EIA entspricht (Storms, 2003). Viele dieser Athleten haben keine Asthmavorgeschichte oder Asthmafälle in der Familie (Mannix, Roberts, Fagin, Reid & Farber, 2003; Storms, 1999).

Eine Beziehung zwischen der Belastung und der Entstehung von Asthma steht im Zusammenhang mit den Auswirkungen thermaler oder osmotischer Stimuli auf die Atemwege. Das kann zu einer wiederholenden Überstimulation des Mechanismus führen, der vor einer durch trockene Luft induzierten Schädigung der Schleimhaut der Atemwege schützt. Diese Schädigung kann zu einer chronischen Entzündung führen und trägt letztendlich zur Entstehung von belastungsinduziertem Asthma bei (Nystad, 2000).

Meist treten die ersten Anzeichen 8-15 Minuten nach Ende einer intensiven Belastung auf (Früh-Phase) (Tan & Spector, 1998). Typische Erscheinungen sind: Brustenge, Kurzatmigkeit, Erschöpfung und Husten; Kinder mit EIA berichten auch über Bauchschmerzen (Spector, 1993). Einige Patienten beschreiben auch eine zweite Phase der Einschränkung der Atemwegsfunktion einige Stunden nach Belastungsende, diese Phase wird als so genannte Spät-Phase bezeichnet. Dabei nimmt die Lungenfunktion innerhalb der ersten 10 – 20 Minuten rapide ab und erholt sich während der nächsten zwei Stunden allmählich wieder. Die „Frühreaktion“ ist auf Histamin und Prostaglandin D₂ (PGD₂), die Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ und PAF zurückzuführen. Auch Proteasen werden freigesetzt: Tryptase spaltet C3a und Bradykinin aus Proteinvorstufen ab, was zur Kontraktion der Bronchialmuskelzellen und Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt, Chymase hingegen fördert die Schleimsekretion (Gemsa, Vorlaender & Albert, 1997). Nach 4 – 6 Stunden beginnt die Spätreaktion, in der vor allem Eosinophile durch LTB₄ und PAF in das Gewebe gelockt werden (Tan & Spector, 1998).

Obwohl es infolge einer Belastung sowohl bei Gesunden, als auch bei Asthmatikern zu einer Bronchodilatation kommt, kann es während der frühen Erholungsphase zu einer Bronchokonstriktion kommen (Bonsignore, Morici et al., 2003), die als belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bezeichnet wird und die sich über eine 10%ige Reduktion der maximalen Ausatemrate und FEV₁ von Prä- und Post-exercise (Bonsignore et al., 2003; Capao-Filipe, Moreira, Delgado, Rodrigues & Vaz, 2003; Spector, 1993; Storms, 2003; Tan & Spector, 1998) definiert. Ein Anfall wird als moderat bezeichnet, wenn es zu einer 30%igen Reduktion der FEV₁ nach Belastung kommt (Anderson, 2006).

Derzeit existieren unterschiedliche Meinungen über die pathologischen Hintergründe, die für das Auftreten eines belastungsinduzierten Asthmas verantwortlich sind, z.B. ein respiratorischer Wasserverlust oder die Kälte der Atemluft. Die Rolle der

Histamine dabei ist unklar, weil der Nachweis im Serum nach einem Asthmaanfall sehr widersprüchlich ist. Kürzliche Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Freisetzung von Leukotrienen und Prostaglandinen bedeutende Rollen beim EIA spielen könnten. McFadden & Gilbert (1994) betonen jedoch die Wichtigkeit, Belastung als Auslöser von Asthma deutlich von Allergien als Asthmaauslöser zu trennen.

Pathophysiologische Theorien

1. Wärmeaustausch

Diese Theorie ist eine vorherrschende Theorie für die Entwicklung von EIA. Nach dieser Theorie ist kalte Luft der Auslöser für die Verengung der Bronchien. Dabei führt insbesondere eine Belastung bei kalter Luft mit anschließender schneller Erwärmung der Atemwege zu EIA (Anderson & Daviskas, 2000). Allerdings erklärt dies nicht, warum die kleinen Atemwege, die nicht mit der kalten Luft in Berührung kommen, sich trotzdem verengen. Erklärungen dafür könnten humorale Effekte oder nervale Reaktionen sein (Cummiskey, 2001).

2. Osmotische Hypothese

Diese Theorie basiert darauf, dass die Dehydrierung und der osmotische Effekt des Wasserverlusts, durch Austrocknung der Atemwege infolge der Einatmung großer Mengen trockener Luft bei Belastung, zu einer Verengung der glatten Bronchialmuskulatur führen (Anderson, 1984).

3. Vaskuläre Veränderungen

Sowohl Asthmatiker als auch „Normale“ Personen kühlen ihre Atemwege auf dieselbe Weise. Der Anstieg der Temperatur in asthmatischen Atemwegen ist allerdings schneller (doppelter Anstieg in 30 Sekunden). Das bedeutet, dass hier Differenzen zwischen normalen und asthmatischen Atemwegen existieren, die den Effekt der Wärmeaustauschtheorie verstärken könnten.

4. Inflammatorische Transmitter

Leukotriene spielen eine wichtige Rolle bei der Verengung der Atemwege, insbesondere nach sich wiederholenden Belastungen. Sie agieren durch die

Freisetzung von Prostaglandin-Hemmern oder durch die Hemmung anderer Mediatoren (Cummiskey, 2001).

Aufgrund neuerer Erkenntnisse ist jedoch davon auszugehen, dass insbesondere intensive Ausdauerbelastungen zu einem Wasserverlust durch Verdunsten auf der Oberfläche der Atemwege führen und damit bei Asthmatikern zu einem Anfall führen. Bei Leistungssportlern kann dieser Wasserverlust ebenfalls zu einer Dehydrierung und Abkühlung der Atemwegsoberfläche führen (Anderson, 2006). Das Einatmen von trockener kalter Luft, während Belastung, kann dabei häufig als der Grund für höhere Bronchospasmen angesehen werden. Ein Training bei warmer feuchter Luft könnte das Auftreten von EIA abschwächen oder verhindern. Der Grund, warum es zu einer Dehydrierung und damit zu einer Verengung der Atemwege kommt, scheint u.a. bei den inflammatorischen Mediatoren zu liegen, die aufgrund eines Anstiegs der Osmolarität der Atemwegsoberfläche freierwerden. Belastungen in der Kälte führen dazu, dass die kleinen Atemwege schneller erreicht werden und dass führt zu einer Zunahme der Oberfläche die dehydriert und hyperosmolar wird (Anderson & Daviskas, 2000).

Folglich scheint das EIA durch eine Wechselwirkung zwischen Prädisposition, Wasserverlust, Erwärmung der Atemwege und freigesetzter Mediatoren ausgelöst zu werden. Die Regulation der freigesetzten Mediatoren auf Genexpressionsebene ist Thema dieser Studie.

Rolle der inflammatorischen Zellen und ihrer Mediatoren beim Asthma

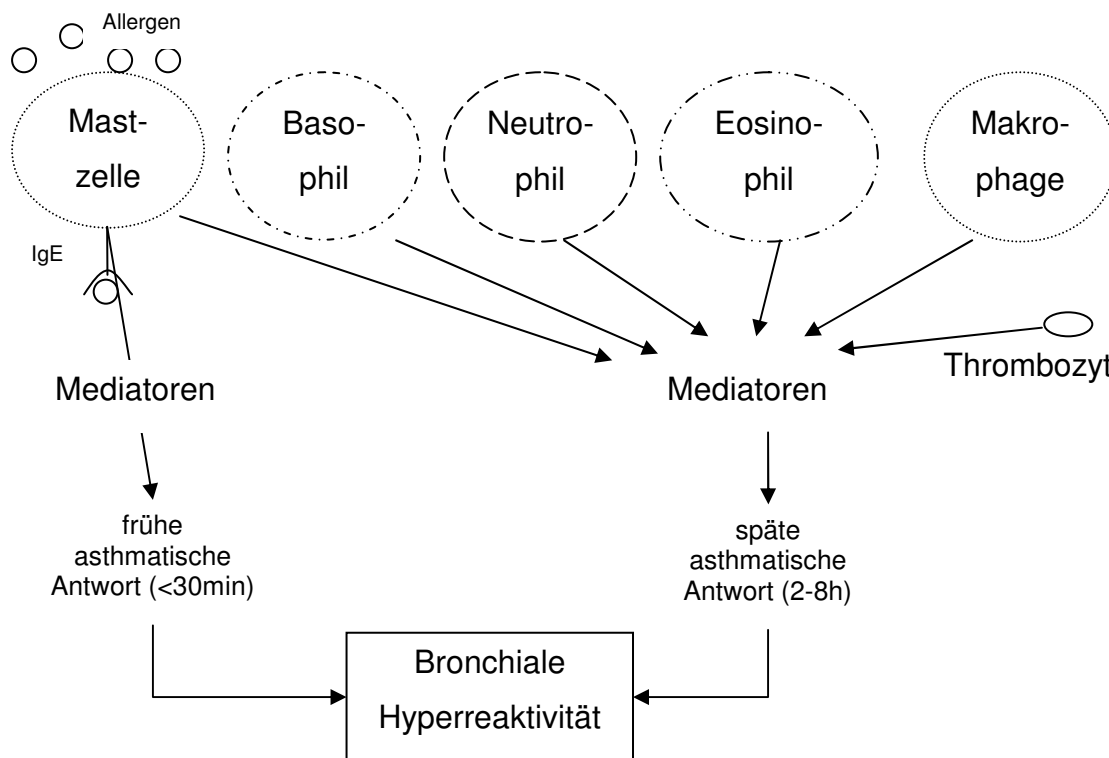


Abbildung 5: Rolle der inflammatorischen Zellmediatoren der frühen und späten asthmatischen Antwort (nach Henderson (1994a))

Eine weitere wichtige Rolle bei der Inflammation spielen die T-Helfer Zellen. Aus einer ursprünglich nicht determinierten TH₀-Zelle kann sich durch unterschiedliche Wege in der Antigenpräsentation entweder eine TH₁- oder TH₂-Zelle bilden.

TH₁-Zellen sezernieren vor allem Interleukin 2, Interferon- γ , TNF- β sowie GM-CSF und führen über Makrophagen-Aktivierung vor allem zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglichen (Burmester, Pezzutto & Ulrichs, 1998).

TH₂-Zellen bilden vor allem Interleukin 4 und Interleukin 5 (daneben IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 und IL-14) und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. (Burmester et al., 1998).

Beide TH-Zellgruppen sind in der Lage, durch die eigenen Zytokine die jeweils andere Zellgruppe in ihrer Aktivierung zu inhibieren. So führt Interferon- γ zu einer Behinderung der TH₂-Zellen, während IL-10 die Makrophagen-Aktivierung behindert und zur ausgeprägten Immunsuppression führt. Umgekehrt wirken die charakteristischen Zytokine positiv verstärkend auf die jeweilige Subpopulation, so z.B. IL-2 auf TH₁- und IL-4 auf TH₂-Zellen.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass beide Zelltypen jeweils ein bestimmtes Muster von Chemokin-Rezeptoren exprimieren. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass CCR5 und CXCR3 vorrangig von TH₁-Zellen exprimiert werden, wohingegen TH₂-Zellen in erster Linie CCR3, CCR4 und CCR8 exprimieren. Chemokine wie CXCL10 und CXCL9 (bindet CXCR3), CCL17 und CCL22 (bindet CCR4) können als TH₁- oder TH₂-Chemokine bezeichnet werden (Bisset & Schmid-Grendelmeier, 2005). Das Potential für Wechselwirkungen zwischen TH₁ und TH₂-Zellen konnte über die Beobachtungen, dass CCR1 über IL-12 auf TH₁-Zellen hochexprimiert wird, bestätigt werden (Colantonio, Iellem & Clissi, 1999), wohingegen CXCR4 über IL-4 in seiner Expression auf TH₂-Zellen herunterreguliert wird (Jourdan, Abbai & Noraz, 1998).

Eine wichtige pathologische Eigenschaft des Asthmas ist eine chronische lokale Entzündung die aus der selektiven Rekrutierung von TH₂-Zellen und Eosinophilen resultiert. Diese korreliert mit der Stärke der Krankheit (Bisset & Schmid-Grendelmeier, 2005).

Humorale Mediatoren der Bronchokonstriktion

Temperaturveränderungen und osmotische Veränderungen der Atemwege führen dazu, dass die Mastzellen der Atemwege und die zirkulierenden Basophilen während einer Belastung Mediatoren freisetzen, die die Inflammation, die Mukussekretion, die Kontraktion der glatten Muskulatur und die Vasodilatation beeinflussen (Anderson, 1985; Spector, 1993).

Immunantworten, die überwiegend durch eine Stimulation der TH₂-Zellen getragen werden, führen zu einer hohen allergenspezifischen IgE-Produktion der B-Lymphozyten und zu weiteren charakteristischen Merkmalen allergischer Immunreaktionen (Klimek & Hansen, 2003). Aktivierte T-Lymphozyten lenken das Freiwerden von inflammatorischen Mediatoren aus den Eosinophilen, Mastzellen und Lymphozyten. Eine Subklasse der T-Helferzellen, die TH₂-Zellen produzieren in erster Linie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Insbesondere die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 spielt bei der Aktivierung von Mastzellen, Eosinophilen und bei der IgE Antikörperproduktion auf ruhenden B-Zellen eine entscheidende Rolle, was wiederum bei der Regulation von allergischen Reaktionen, insbesondere beim Asthma bedeutend ist. Die Umwandlung von IgM zu IgE Antikörpern wird durch die Interaktion von IL-4 und IL-13 gesteuert (Fireman, 2003). Die Kreuzverbindung von zwei IgE-Molekülen infolge eines Allergens führt zur Degranulation von Mastzellen und dem damit verbundenen Freiwerden von Histaminen, Leukotrienen und anderen Mediatoren, die für eine Atemwegsentszündung verantwortlich sind. Interleukin 5 ist ebenfalls verantwortlich für die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen (Fireman, 2003). Die Serumkonzentrationen der Basophilen, der Histamine, Leukotrienen und Katecholaminen sind bei EIA generell erhöht (Belcher, O'Hickey, Arm & Lee, 1988; Lee, T. H., Nagakura et al., 1984). Mastzellen und Eosinophile sind potentielle Quellen von bronchokonstriktorisches Mediatoren (Anderson & Brannan, 2002). Mastzellen setzen in erster Linie Histamine, Leukotriene und Prostaglandin D₂ frei, Eosinophile produzieren ebenfalls Leukotriene. Beide dieser Zelltypen kommen in größeren Mengen vorrangig in den Atemwegen von Asthmatikern vor, wobei der absolute und prozentuale Anteil der Eosinophilen größer ist, als der der Mastzellen (Anderson & Brannan, 2002). Besonders die Eosinophilen spielen eine entscheidende Rolle beim EIA, denn es konnte gezeigt werden, dass Asthmatiker mit EIA einen höheren prozentualen Anteil von Eosinophilen haben, als welche ohne EIA (Kivity, Argaman et al., 2000). Für die Chemotaxis von neutrophilen und eosinophilen

Granulozyten hin zum Entzündungsherd (Busse, W. W. & Lemanske, 2001) spielen die Chemokine IL-8 und CCL5 (RANTES) eine entscheidende Rolle (Hashimoto, Gon et al., 2000).

Die nach einer Mastzellen-Aktivierung durch Allergene aus der Arachidonsäure synthetisierten Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxan wirken verzögert, während die präformierten Histamine, IL-8, IL-13, IL-4, IL-5, TNF- α und andere proteolytische Enzyme sofort wirksam sein können.

Tabelle 1: Mediatoren des Asthmas

Quelle: (http://www.ifap-index.de/bda-manuale/asthma/krankheitsbilder/asthma_bronchiale.html)

Mediatoren des Asthmas					
		Effekte			
Mediator		Broncho- konstriktion	Mukus- sekretion	Mikrovaskular- defekt	Chemotaxis
Histamin		+	+	+	+
Prostaglandin	D ₂ , F ₂	+	+	+	
	E ₂ , I ₂	-	+	(+)	-
	TBXA ₂	+		+	
Leukotrien	B ₄	(+)	-	-	+
	C ₄ , D ₄ , E ₄	+	+	+	-
Adenosin		+	+	-	-

Eikosanoidstoffwechsel

Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene zählen zu den Eikosanoiden und sind potentiell pro-inflammatorische Mediatoren, die durch den Einsatz der Lipooxygenase und Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure (AA) freierwerden.

Als Muttersubstanz der Prostaglandine PG I₂, D₂, E₂, F₂ und des Thromboxan A₂, entsteht Prostaglandin H₂ (PGH₂) unter Katalyse der Prostaglandin H₂-Synthase (PGHS). Es gibt zwei Isoformen der PGHS, die als PGHS1 (COX1) und PGHS2 (COX2) bezeichnet werden. PGHS1 wird konstitutiv in vielen Zellen exprimiert, PGHS2 unterliegt einer vielfältigen Regulation. Als allgemeine Regel gilt, dass seine Aktivität durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie IL-1 oder TNF-α induziert wird. Dagegen reprimieren Glukokortikoide und anti-inflammatorische Zytokine die PGHS2-Expression (Picado, 2006).

Die Prostaglandine PGF₂ und PGD₂, sowie das Thromboxan A₂ gelten in ihrer biologischen Aktivität als Bronchokonstriktoren, während hingegen PGI₂ und PGE₂ als Dilatatoren der Bronchien gelten (siehe Tabelle 1) (Henderson, 1994a).

1.6 Leukotrien Biosynthese

Die Verstoffwechselung von Arachidonsäure durch 5-LO initialisiert die Biosynthese von biologisch aktiven Leukotrienen (LTs). Leukotriene sind wichtige Mediatoren bei inflammatorischen und allergischen Reaktionen (Werz, Bürkert, Samuelsson, Radmark & Steinhilber, 2002).

Der initiiierende Schritt in der Leukotrien (LT) Biosynthese ist die Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂). Die PLA₂ hydrolysiert Membran-Phospholipide, die dann die Arachidonsäure freisetzen. Bei der Stimulation von Mastzellen kommt es zu einer kalziumabhängigen Verschiebung von 5-Lipoxygenase aus dem Zytosol oder dem Nukleus zur Kernmembran, wo es durch das Membranprotein 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP) vollständig aktiviert wird. Diese Enzyme katalysieren die Oxygenation der Arachidonsäure und es wird die instabile 5-Hydroperoxyeicosatetrasäure (5-HPETE) gebildet, welche ein Vorläufer von LTA₄ ist. Leukotrien A₄ wird dann durch LTA₄-Hydrolase zu LTB₄ umgewandelt. Alternativ wird LTA₄, mit Hilfe der LTC₄ Synthase, zu den Sulfidopetid-Leukotrienen umgewandelt. Als Sulfidopetid-Leukotriene werden LTC₄, D₄ und E₄ bezeichnet (Henderson, 1994a). Leukotrien B₄ ist eine Dihydroxysäure, welche durch ω -Oxidation von 20-OH- und 20-COOH-Metaboliten inaktiviert wird (O'Byrne, 1997). Leukotrien C₄ wird aktiv aus der Zelle transportiert, wo es darüber hinaus zu LTD₄ und E₄ verstoffwechselt wird. Leukotrien E₄ wird entweder unverändert über den Urin oder die Galle ausgeschieden oder weiter verstoffwechselt zu einer Reihe von biologisch inaktiven Zwischenprodukten, die wiederum ebenfalls über den Urin oder die Galle abgegeben werden.

Die LT Synthese findet nicht, wie ursprünglich angenommen an der Plasmamembran statt, sondern beginnt an der Kernmembran. Die Endprodukte der Leukotriensynthese werden nicht nur exportiert, sondern ein Teil verbleibt in der Zelle, wo sie in den Zellkern wandern.

Die LT Biosynthese findet überwiegend in Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Mastzellen statt und ein Zusammenspiel der verschiedenen Schlüsselenzyme ist zwingend erforderlich für eine effiziente Bildung der entsprechenden Mediatoren (Werz, 2002).

ALOX5 bzw. 5-Lipoxygenase (5-LO)

Die Expression des 5-LO Proteins erfolgt vorwiegend in myeloiden Zellen, insbesondere Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und B-Zellen und deckt sich weitgehend mit der Expression von FLAP (Steinhilber, 1994). Obwohl T-Zellen FLAP exprimieren sind sie 5-LO negativ. Erythrozyten und Thrombozyten, ebenso wie Endothelzellen exprimieren weder FLAP noch 5-LO.

Zellstress führt zu einer Aktivierung von p38MAPK und induziert die 5-LO Produktbildung in Leukozyten (Radmark, O. & Samuelsson, 2005). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass infolge eines Stressesstimulus über den p38MAPK Signalweg 5-LO aus dem Zellkern exportiert wird und in einer bi-direktionalen Regulation der Enzymaktivität resultiert (Hanaka, Shimizu & Izumi, 2005).

Die Regulation der 5-LO Expression wurde in verschiedenen Zelllinien untersucht. So konnte beispielsweise in Monozyten und monozytischen THP-1 Zellen durch GM-CSF eine erhöhte Expression von 5-LO und FLAP nachgewiesen werden (Radmark, O. P., 2000).

ALOX5AP bzw. 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein (FLAP)

Die Rolle von FLAP in der LT Biosynthese ist bisher noch relativ unklar. FLAP befindet sich überwiegend in der Kernhülle von ruhenden und aktivierten Zellen (Peters-Golden, 1998). FLAP ist in erster Linie ein membrangebundenes Protein (Plante, Picard, Mancini & Borgeat, 2006), welches auch mit dem endoplasmatischen Retikulum in Kontakt tritt (Peters-Golden & McNish, 1993; Radmark, O. P., 2000; Woods, Evans et al., 1993) und von MK-886 und MK0591 (Flamand, Lefebvre, Surette, Picard & Borgeat, 2006) gehemmt werden kann (Werz, 2002). Die Expression von FLAP steht im engen Zusammenhang mit dem Vorkommen des 5-LO Proteins in Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und B-Lymphozyten. Eine Hochregulation von FLAP korreliert oftmals mit der von 5-LO (Steinhilber, 1994; Vickers, 1995). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass FLAP nicht länger als Docking-Protein für 5-LO bezeichnet werden kann, sondern viel mehr als Transferprotein für die Arachidonsäure fungiert (Abramovitz, Wong et al., 1993). Die freie Arachidonsäure bindet an FLAP und wird dann der 5-LO präsentiert, damit die Oxygenationsreaktion stattfinden kann (Flamand et al., 2006). Während dieser Reaktion kommt es zu keiner Bindung zwischen FLAP und 5-LO. Obwohl zahlreiche experimentelle Daten eine mögliche Interaktion zwischen 5-LO und FLAP aufzeigen,

ist ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen noch nicht gezeigt worden (Werz, 2002). Plante et al. (2006) bestätigten, dass FLAP und 5-LO miteinander assoziieren, oder zumindest in enger Nachbarschaft auf der Kernmembran liegen.

Leukotriene

Bei den Leukotrienen unterscheidet man zwei Gruppen: Cysteinyl-Leukotriene (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) und Dihydroxyl-Leukotriene (LTB₄). Beide spielen wichtige Rollen bei inflammatorischen Krankheiten und allergischen Reaktionen. Leukotrien B₄ spielt eine wichtige Rolle insbesondere bei der Inflammation, es bewirkt einen Anstieg der IL-6 Produktion der Monozyten, stimuliert die Chemotaxis und Aktivierung der Neutrophilen und damit die Degranulation und das Freiwerden von Mediatoren und Enzymen. Außerdem erhöht es die Interaktion der Neutrophilen mit dem Endothel und fördert damit die Bronchokonstriktion (Busse, W. W., 1998). LTB₄ wird hauptsächlich in Leukozyten gebildet und fungiert als eines der stärksten Chemoerreger und Stimulator für Leukozyten. LTB₄ ist bei vielen Krankheiten involviert, bei denen Leukozyten eine wichtige Rolle spielen. LTB₄ aktiviert inflammatorische Zellen, indem es an deren Zelloberfläche über zwei bekannte Rezeptoren (BLT1 und BLT2) bindet. Die Cysteinyl-Leukotriene verstärken die Kontraktion der glatten Muskulatur in den Atemwegen, greifen zusätzlich an der Muskulatur der Bronchialgefäße an und bewirken dort eine Vasodilatation und erhöhen die vaskuläre Permeabilität. Außerdem erhöhen sie die Mukussekretion. Prozessen, die für die Bewegung und Rekrutierung von Leukozyten, als Reaktion auf eine Inflammation entscheidend sind, werden von den CysLTs gesteuert und führen zu Atemwegsödemen.

Kürzlich wurde ihr G-Protein-bindender-Rezeptor geklont. Die Identifikation dieses Rezeptors ermöglicht es die Genstruktur zu analysieren, sowie die Regulation der Expression und die Signaltransduktion in der Zelle zu beobachten. Außerdem kann die molekulare Aufschlüsselung zur Entwicklung eines brauchbarer Antagonisten, z.B. für die Behandlung von allergischen Reaktionen, wie Asthma, beitragen.

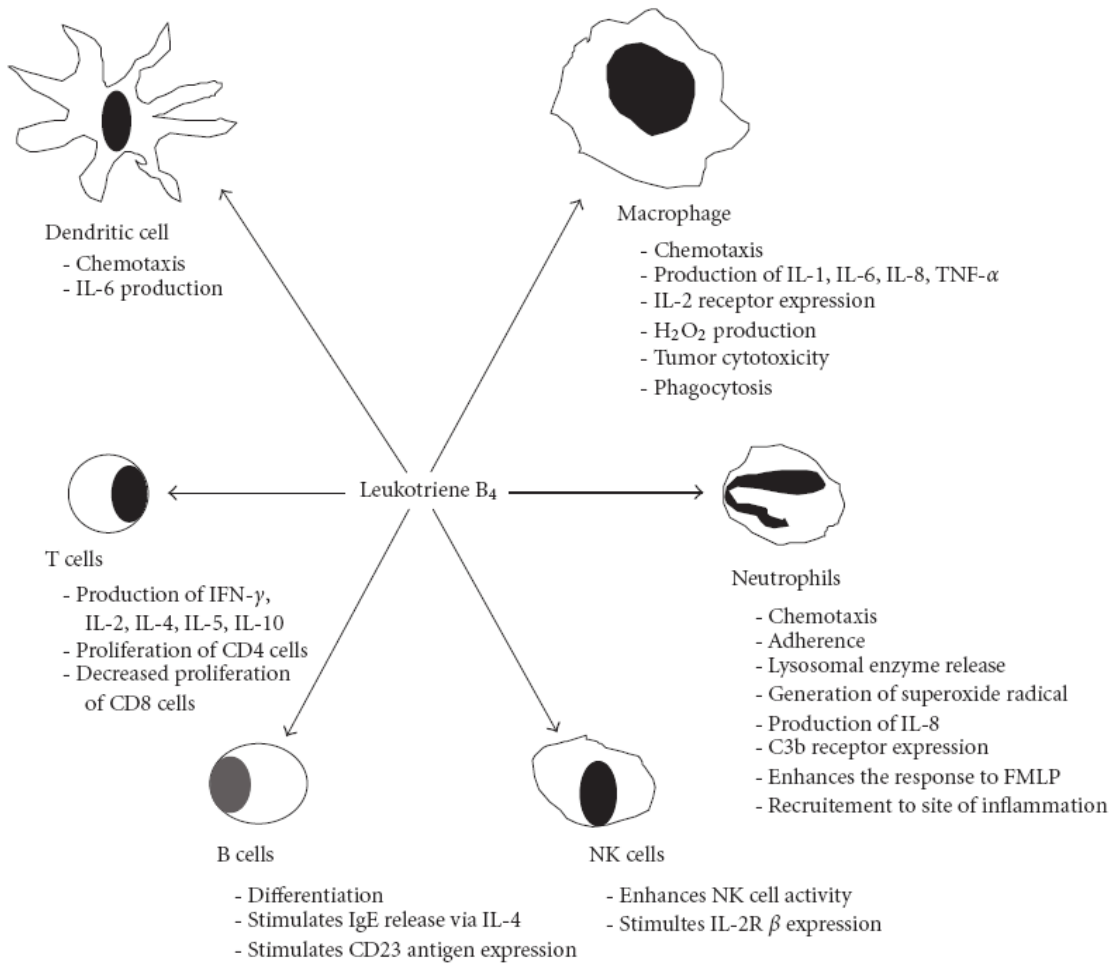


Abbildung 6: Effekte von LTB₄ auf die Zellen des Immunsystems (Hedi & Norbert, 2004)

Die Leukotrien-Rezeptoren

Leukotriene üben ihre biologische Wirkung durch Anbindung und Aktivierung an spezifische Rezeptoren aus.

Es gibt vier bekannte G-Protein-gebundene-Rezeptoren (GPCRs), die als Zelloberflächen-Rezeptoren der Leukotriene beim Menschen fungieren. Zwei von ihnen sind Rezeptoren für LTB₄ (BLT1 und BLT2), und die anderen beiden sind die Rezeptoren der Cysteinyl - Leukotriene (CysLT1 und CysLT2). Die zwei Subtypen der Rezeptoren der Cysteinyl – Leukotriene wurden bereits pharmakologisch identifiziert, aber ihre molekulare Struktur ist noch weitgehend unbekannt (Drazen, Israel & O'Byrne, 1999).

BLT1 und BLT2

BLT1 ist charakterisiert als ein 43-kd GPCR, der nur von inflammatorischen Zellen, wie Neutrophilen, alveolaren Makrophagen und Eosinophilen mit einer hohen Affinität lediglich für LTB_4 exprimiert wird (Kato, Yokomizo, Izumi & Shimizu, 2000). Eine Expression von BLT1 mRNA wurde auch in peripheren Leukozyten nachgewiesen. Niedrige Level einer BLT1-Expression wurden des Weiteren in der menschlichen Milz und Thymus beobachtet.

Der hochaffine Rezeptor BLT1 vermittelt Chemotaxis, Chemokinese, Aggregation und das Anhaften an das Endothel (Izumi, Yokomizo, Obinata, Ogasawara & Shimizu, 2002).

Menschliche BLT2 mRNA wird reichlich in der Milz, gefolgt von der Leber, den Hoden und Leukozyten exprimiert. Des Weiteren wurden schwache Signale in allen Geweben beobachtet (Yokomizo, Kato, Terawaki, Izumi & Shimizu, 2000).

BLT2 ist ein Rezeptor mit einer geringen Affinität für LTB_4 , der auf andere Eikosanoide reagiert. Er wird in vielen Geweben und nicht nur in Leukozyten exprimiert (Izumi et al., 2002). Der niedrigaffine Rezeptor BLT2 vermittelt Degranulation und das Freiwerden von Sauerstoffradikalen (Henderson, 1994b).

Beide Rezeptoren sind in Lymphknoten nachgewiesen wurden (Christie & Henderson, 2002), auf dem selben Chromosom, aber erstaunlicherweise ist die Promoterregion von BLT1 auf dem open reading frame von BLT2 lokalisiert, welche mit einer niedrigen Affinität den Rezeptor für LTB_4 enkodiert (Kato et al., 2000). Ebenso wichtig zu bemerken ist, dass LTB_4 an den intranuklearen Transkriptionsfaktor $\text{PPAR}\alpha$ binden und diesen aktivieren kann. Das führt zu einer Aktivierung der Gene, die den inflammatorischen Prozess steuern (Yokomizo et al., 2000).

CysLT1 und CysLT2

Pharmakologische Untersuchungen konnten zwei Arten von Cysteinyl - Leukotrien-Rezeptoren nachweisen: CysLT1 und CysLT2. Die CysLT Rezeptoren unterscheiden sich deutlich von den LTB₄ Rezeptoren.

Der *CysLT1* Rezeptor, auch bekannt als LTD₄-Rezeptor, oder LTR_d, ist ein 45-kD membranassoziertes Protein, welches vor allem in menschlichen Bronchialmuskelzellen, im vaskulären Endothel, Lungenmakrophagen und peripheren Blutleukozyten vorkommt (Drazen, 1998). Mit Hilfe der Northern blot analysis konnte die CysLT1 mRNA Expression vor allem in der Milz, der peripheren Leukozyten und weniger stark in der Lunge, den Eingeweiden, dem Pankreas und der Plazenta nachgewiesen werden (Sarau, Ames et al., 1999). Die Stimulation des CysLT1 Rezeptors resultiert in einer starken Bronchokonstriktion verbunden mit einer Signaltransduktion, die zusammen mit einer Verschiebung der Phosphoinositide einher geht (Drazen, 1998).

Der *CysLT2* Rezeptor, auch bekannt als LTC₄-Rezeptor oder LTR_c, wurde pharmakologisch bei der Präparation von Pulmonalvenen und in den vaskulären glatten Muskeln der Lunge nachgewiesen (Drazen, 1998).

Die meisten Aktionen der Cysteinyl – Leukotriene werden über den CysLT1-Rezeptor vermittelt (Henderson, 1994a). Zu diesen Aktionen gehören die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, die Chemotaxis und die erhöhte vaskuläre Permeabilität (Drazen, 1999). Northern blotting von CysLT2 mRNA zeigte hohe Expressionen im Herz, der Plazenta, adrenergen Drüsen, peripheren Leukozyten, der Milz und Lymphknoten, jedoch mit einer niedrigeren Expression entlang des ZNS. *In situ* Studien wiesen eine starke Expression von CysLT2 in interstitiellen Lungenmakrophagen, aber eine geringe Expression in glatten Lungenmuskelzellen nach (Izumi et al., 2002).

1.7 Hinleitung zur Fragestellung

Die Mikroarraytechnik zur Bestimmung der Genexpression und die Validierung der Ergebnisse mittels Real-Time PCR Analyse erlauben es in neuer Qualität, bislang unbekannte intrazelluläre Wechselwirkungen aufzudecken, dadurch neue Beziehungen zwischen immunologischen Signalpathways nach physischem Stress zu untersuchen und mittelfristig neue diagnostische und therapeutische Interventionen abzuleiten.

Belastungsinduziertes Asthma oder asthmaartige Symptome sind allgemeine Gesundheitsprobleme, die die gesamte Bevölkerung betreffen, darunter vor allem Kinder, aber auch Leistungssportler. Bei 10-15% der Leistungssportler und 12% der Schulkinder (Abu-Hasan, Tannous & Weinberger, 2005; Anderson, 2002; Ciprandi, Frati et al., 2003; Kikawa, Miyanomae et al., 1992; Tan & Spector, 1998) kommt es zu einer belastungsinduzierten Bronchokonstriktion und/oder belastungsinduziertem Asthma während oder meist nach einer Belastung (Carlsen & Carlsen, 2002; Rundell & Jenkinson, 2002; Rundell et al., 2000; Spector, 1993; Starkie, R., Ostrowski, Jauffred, Febbraio & Pedersen, 2003; Storms, 2003). Obwohl einige Studien insbesondere das belastungsinduzierte Asthma hinsichtlich der immunologischen Veränderungen untersucht haben, besteht über die regulatorischen Mechanismen weitgehend Unklarheit. Untersuchungen zeigten vor allem, dass Histamine, Prostaglandine und Leukotriene wichtige Mediatoren der asthmatischen Reaktion sind (Rundell et al., 2000). Es ist außerdem nachgewiesen, dass es nach einer Belastung zu einer Stimulation des Arachidonstoffwechsels kommt und in dessen Folge zu einem Anstieg der Leukotriene. Die Leukotriene stellen die wichtigsten Mediatoren in der Asthmaantwort dar und das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese ist das ALOX5 (Bürkert, Szellas, Radmark, Steinhilber & Werz, 2003; Steinhilber, 1994; Werz, 2002; Werz, Bürkert et al., 2002; Werz, Bürkert, Samuelsson et al., 2002; Werz, Klemm, Samuelsson & Radmark, 2000; Werz, Klemm, Radmark & Samuelsson, 2001; Werz, Szellas, Steinhilber & Radmark, 2002). In einer ersten Studie konnte bereits an 6 Probanden eine belastungsinduzierte erhöhte Expression von ALOX5 und ALOX5AP nachgewiesen werden (Hilberg, Deigner et al., 2005). Allerdings klärt das noch nicht die Frage, warum es bei hochausdauertrainierten Athleten so häufig zu Symptomen des EIA kommt. Der Nachweis ob es bei diesen Elitesportlern zu einer besonderen

Disposition zum EIA auf molekularbiologischer Ebene kommt, ist bis jetzt nicht aufgeklärt. Mit Hilfe der vorliegenden Studie sollte aufgeklärt werden, ob die – in einer Vorstudie – nachgewiesenen belastungsinduzierten Veränderungen in der Genexpression des Leukotrienstoffwechsels auch in einer größeren Probandengruppe reproduzierbar sind und vor allem, ob der ausdauerspezifische Trainingsstatus hierauf einen direkten Einfluss ausübt. An dieser Stelle ist aber auch noch einmal ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es sich bei den untersuchten Probanden NICHT um Asthmatiker oder Personen mit Symptomen des Exercise-induced asthma, sondern um ein gesundes Untersuchungsklientel handelt. Denn das angestrebte Ziel war es, die belastungs- und trainingsinduzierten Effekte in Bezug auf asthmarelevante Gene zu untersuchen.

2 Fragestellung

Verschiedene Ursachen werden für das EIA verantwortlich gemacht, dabei unter anderem Veränderungen im Leukotrienstoffwechsel und weitere Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene. In dieser Studie sollten belastungsinduzierte und trainingsinduzierte (Ausdauertraining) Veränderungen im Leukotrienstoffwechsel und weiterer asthmarelevanter Genaktivitäten auf molekularer Ebene zunächst bei gesunden Probanden untersucht werden. Dies diene dazu ein grundlegendes Expressionsmuster bei Gesunden nach Belastung und Training zu entwickeln, um hieraus Erkenntnisse für die grundlegende Funktionsweise des Leukotrienstoffwechsel aber auch andere Gene zu gewinnen. Erst bei zusätzlicher noch unbekannter Prädisposition in Kombination mit den Veränderungen z.B. im Leukotrienstoffwechsel kommt es dann zum Vollbild des EIA. Im Einzelnen sollten folgende zwei zentrale Fragestellungen beantwortet werden.

1. Welche belastungsinduzierten Veränderungen (Fahrradbelastung mit 80% IAS über 90 min) sind bei spezifischen asthmarelevanten Genen nachweisbar?
2. Welchen Einfluss hat der Trainingsstatus auf die Genexpression spezifischer asthmarelevanter Gene vor und nach akuter körperlicher Belastung?

3 Material und Methoden

Verwendete Lösungen/ Chemikalien/ Kits:

Zellkultivierung:

Iscove's Medium	- Biochrom AG, Deutschland
20% Fetales Bovines Serum (FBS)	- Biochrom AG, Deutschland

RNA-Extraktion:

PAXgene tubes	- Qiagen, Hilden, Deutschland
PAXgene Blood RNA Kit	- PreAnalytiX (Qiagen), Deutschland
RNeasy Midi Kit	- Qiagen, Deutschland
NucleoSpin®RNA L (MonoMac Zellen)	- Macherey-Nagel, Schweiz
Rneasy Midi Kit (SIG-M5 Zellen)	- Qiagen, Deutschland

Lab-on-a-Chip Kit:

RNA 6000 Nano Reagents & Suppliers	- Agilent Technologies, USA
------------------------------------	-----------------------------

Reverse Transkription:

Superscript II RNase H- reverse transcriptase	- Invitrogen, Deutschland
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease In-R	- Invitrogen, Deutschland
dNTP Set, 100 mM Solution (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	- Amersham Biosciences, Österreich
5-(3-Aminoallyl)-2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate (AA-dUTP)	- Sigma, Deutschland
Oligo-dT Primer T18V	- MWG Biotech, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	- Sigma, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	- Merck, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	- Invitrogen, Deutschland
5x Reverse Transkriptase-Puffer	- Invitrogen, Deutschland

RNA-Hydrolyse:

Natriumhydroxid (NaOH)	- Merck, Deutschland
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	- Merck, Deutschland
Tris oder HEPES	- Merck/ Roth, Deutschland

cDNA Reinigung:

Microcon YM-30 - Millipore, USA

Spikes (10 ng/μl):

mRNA Spike 1 (1 : 100) - Stratagene, USA
mRNA Spike 2 (1 : 10.000) - Stratagene, USA
mRNA Spike 4 (1 : 100) - Stratagene, USA
mRNA Spike 8 (1 : 100) - Stratagene, USA
mRNA Spike 9 (1 : 100) - Stratagene, USA
mRNA Spike 10 (1 : 100) - Stratagene, USA

Markierungsreagenzien:

Aufreinigungs-System (Kit9) - Promega, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) - Sigma, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) - Merck, Deutschland
DY-548-S-NHS Reactive Dye - Dyomics, Deutschland
DY-648-S-NHS Reactive Dye - Dyomics, Deutschland
Humane Cot-1 DNA (1 μg/μl) - Invitrogen, Deutschland

Optimierung der Fluoreszenzmarkierung:

MonoMac RNA - SIRS-Lab GmbH Jena

Reinigung der fluoreszenzmarkierten cDNA:

QIAquick PCR Purification Kit (50) - Qiagen, Deutschland

Hybridisierungsvorbereitung:

Formamide - Merck, Deutschland
Hefe-tRNA (10 μg/μl) - Invitrogen, Deutschland
Polyadenylic Acid (5') (PolyA) ((10 μg/μl) - Sigma, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) - Merck, Deutschland
Natriumdisulfid (SDS) - Merck, Deutschland
20x Natriumzitrat 1l (SSC) - Ambion, USA
10% Natriumdisulfid 1l (SDS) - Ambion, USA
Natriumchlorid (NaCl) - Merck, Deutschland

Epoxy slides (Nexterion® Slide E)	- Schott AG, Deutschland
4x QMT Blocking Solution	- Schott AG, Deutschland

Verwendete Laborgeräte:

Spektrophotometer (Nanodrop®)	- Nanodrop (Rocksland, USA)
Pipetten	- Eppendorf (München, Deutschland)
Gelgießkammer	- Bio-rad (München, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	- Bio-rad (München, Deutschland)
2100 Bioanalyzer	- Agilent (Waldborn, Deutschland)
Mini Spin Zentrifuge	- Eppendorf (München, Deutschland)
Zentrifuge 5415 R	- Eppendorf (München, Deutschland)
Zentrifuge 5810R	- Eppendorf (München, Deutschland)
Scanner GenePixTM 4000B	- Axon Instruments (Foster City, CA)
Hybridization Station HS 400	- Tecan (Crailsheim, Deutschland)
OmniGridTM Spotting Roboter	- GeneMachine (San Carlos, USA)
Slide box (für 100 Slides)	- Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Slide rack	- VWR (Darmstadt, Deutschland)
Plastic boxes 500 ml (103/103/64)	- Merck (Darmstadt, Deutschland)
CO ₂ Brutschrank	- Nalge Nunc International
Sterilbox Abzugshaube	- Heraeus (Deutschland)
Gel Doc 2000	- Bio-rad (München, Deutschland)
Thermomixer	- Eppendorf (München, Deutschland)
Vortexer	- IKA (Staufen, Deutschland)
Reinstwasseranlage PurelabTMPlus	- ELGA Labwater (Ransbach, Deutschland)
Speedvac Concentrator 5301	- Eppendorf (München, Deutschland)
Flexülen	- Sarstedt (Deutschland)

3.1 Studiendesign

Die Gesamtstudie war eine Querschnittsstudie mit einem kontrollierten Studiendesign bestehend aus zwei Gruppen. In die Untersuchung wurden 41 klinisch gesunde Männer im Alter zwischen 20 und 30 Jahren eingeschlossen (unabhängige Stichprobe, matched samples). Gruppe 1 bestand aus 21 Probanden mit einer Ausdauerleistungsfähigkeit, bestimmt über die maximale Sauerstoffaufnahme von mindestens ≥ 65 ml/kg/min; Gruppe 2 umfasste 20 Probanden mit einer maximalen Sauerstoffaufnahme von maximal ≤ 50 ml/kg/min. Aufgrund einer für den Hybridisierungsprozess nicht ausreichende Menge an selektierter RNA mussten aus der Gruppe 1, ein Proband und aus der Gruppe 2, drei Probanden ausgeschlossen werden. Alle weiteren angegebenen Ergebnisse beziehen sich damit auf N=37 (Trainierte N=20 und Untrainierte N=17).

3.2 Probanden

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

An dieser Studie konnten gesunde männliche Nichtraucher im Alter zwischen 20 und 30 Jahren teilnehmen. Ausgeschlossen wurden Probanden die im Zeitraum vor (<4 Wochen) oder während der Studie akute oder chronischen Erkrankungen hatten, insbesondere mit Beteiligung des Immunsystems bzw. der Hämostase. Die Einnahme von Medikamenten (z.B. ASS < als 4 Wochen vor Studienbeginn) stellte ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar. Zur Einteilung in die zwei Gruppen, mussten die Probanden der ersten Gruppe Ausdauertrainierte Männer sein, deren maximale Sauerstoffaufnahme über 65 ml/kg/min lag, die Teilnehmer der zweiten Gruppe waren untrainierte Männer, deren maximale Sauerstoffaufnahme 50 ml/kg/min nicht überschreiten durfte. Die schriftliche und mündliche Aufklärung über die Studie erfolgte nach Erfüllung der Einschlusskriterien und Verneinung aller Ausschlusskriterien. Danach gaben die Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität Jena genehmigt.

3.2.2 Anthropometrische Daten

In die Auswertung der Studie wurden 37 Probanden einbezogen. Die anthropometrischen Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Anthropometrische Daten der Probanden (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, *= $p \leq 0,05$)

	Trainierte (N=20)		Untrainierte (N=17)		Gesamt (N=37)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Alter [Jahre]	24,4	5,0	25,2	4,1	24,8	4,5
Körperhöhe [cm]	181	7,0	180	7,0	180	7,0
Körpermasse [kg]	71,1	9,4	78,8	14,4	75,3	12,3
Körperfettanteil [%]	8,3*	2,9	16,7*	4,8	12,3	5,7
Rel. Herzvolumen [ml/kg]	13,1*	1,3	10,7*	1,1	12,00	1,7

3.3 Gesundheitsbeurteilung und Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit

Vor der Hauptbelastung mussten sich alle Probanden einer Gesundheits- und Leistungsbeurteilung unterziehen. Dieser vorangestellt war eine Analyse der Routinelaborwerte. Im hauseigenen Labor wurden aus dem Blut das große Blutbild und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) gemessen. Des Weiteren wurde das Blut auf das Vorhandensein der Enzyme, Glutaryl- Oxalacetat- Transferase (GOT), Glutaryl- Phenylalanin- Transferase (GPT), Gamma- Glytaryl- Transferase (GGT) und Creatinkinase (CK) getestet. Außerdem wurden die Werte von Kreatinin, Harnstoff, Gesamtcholesterin, Harnsäure, Nüchternblutzucker gemessen, sowie der Status des C- reaktives Proteins (CRP) und des Urins bestimmt. Lagen alle Parameter im Normbereich, konnten die Teilnehmer zur Gesundheits- und Leistungsbeurteilung zugelassen werden.

Die Gesundheitsbeurteilung beinhaltete ein ärztliches Anamnesegespräch, die Abfrage von asthmarelevanten Symptomen mittels eines standardisierten Fragebogens (Li, 1998) (siehe Anhang), die Erfassung der anthropometrischen Größen (dargestellt in Tabelle: 2) und anschließend ein Ruhe-EKG und eine

Echokardiographie. Die anthropometrischen Daten Größe und Gewicht wurden über eine geeichte Waage bzw. über ein handelsübliches Maßband und der Körperfettanteil mittels Kalipermetrie ermittelt. Laut der Deutschen Zeitschrift für Sportmedizin (Herm, 2003) ist die Kalipermetrie die einfachste, kostengünstigste und mit einem Messfehler von 3% eine hinreichend genaue Methode zur Bestimmung des Körperfettanteils. Der Körperfettanteil wurde nach der 10-Punkt Messung nach Parizkova & Buzkova (1971) ermittelt. Dafür wird an zehn definierten Punkten des Körpers mittels eines Kalipers die Dicke der Hautfalte gemessen. Die Summe der Hautfalten ergibt den prozentualen Anteil des Körperfettdepots.

Zur genaueren Beurteilung der Leistungsfähigkeit wurde anschließend eine Spiroergometrie (Oxicon beta, Jäger) mit Belastungs-EKG (AT-10, Schiller) auf dem Fahrradergometer (SRM, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen (Temperatur und Luftfeuchte) durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine stufenförmig ansteigende Belastung, beginnend bei 50 Watt und einer Steigerung um 50 Watt alle 3 Minuten, bis zur subjektiven Ausbelastung. Jeweils am Ende jeder Belastungsstufe und eine, drei, fünf und zehn Minuten nach Belastungsende wurden 20 µl Kapillarblut aus dem Ohrläppchen, für die spätere Laktatbestimmung entnommen.

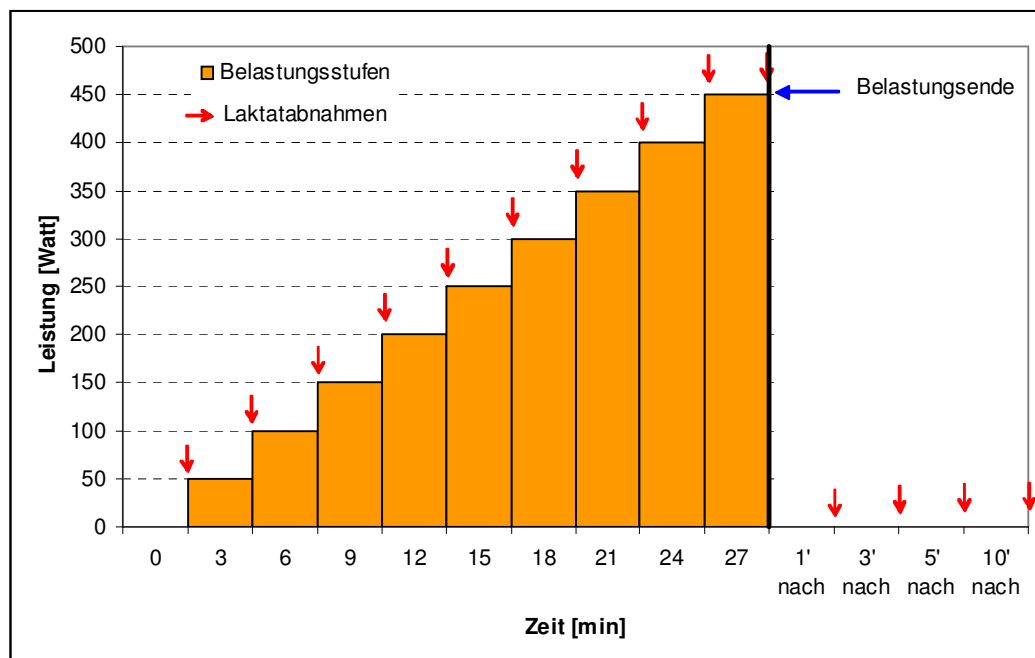
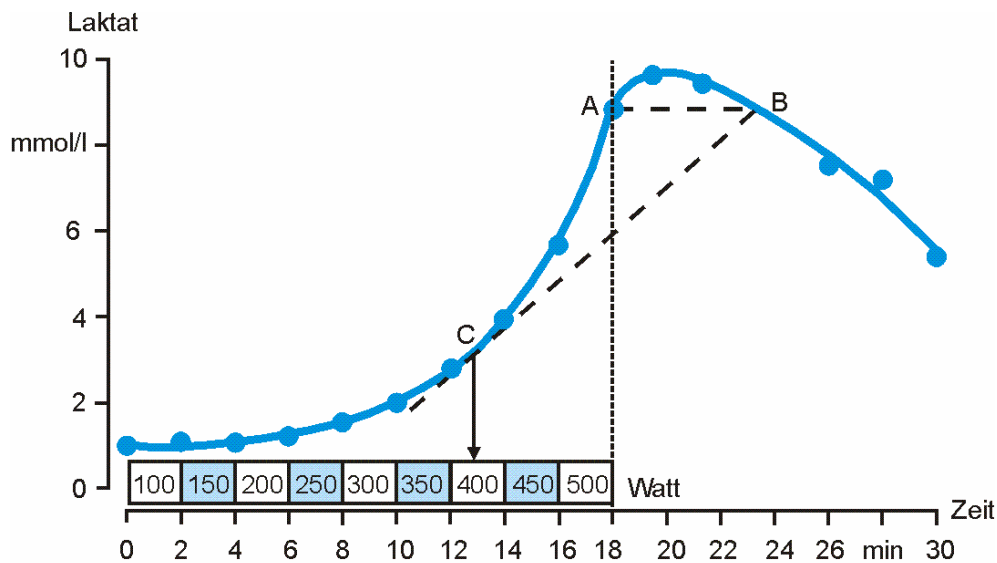


Abbildung 7: Stufentest auf dem Fahrradergometer

Aus denen, aus dem EKG abgeleiteten Herzfrequenzen und den dazugehörigen Laktatwerten auf jeder Stufe kann die so genannte Laktatleistungskurve erstellt werden. Aus dieser lässt sich sowohl rechnerisch, als auch zeichnerisch die individuelle anaerobe Schwelle (IAS) nach Stegmann (1981) ableiten, welche die Dauerleistungsgrenze kennzeichnet und aus der individuelle Trainingsbereiche bestimmt werden können.



de Marées: Sportphysiologie, 2002

Abbildung 8: Bestimmung der Laktatleistungskurve nach Stegmann (de Marées & Heck, 2002))

Aus den gewonnenen Daten lassen sich wichtige Aussagen über die Leistungsfähigkeit treffen. Die maximale Leistung (nach Kindermann (1984): 3 Watt/kg Körpergewicht bei 20 - 30jährigen, untrainierten Männern) und die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max) (nach Kindermann (1984): ≥ 40 ml/kg/min) bei 20 - 30jährigen, untrainierten Männern) stellen dabei zwei wichtige Parameter dar, die Aussagen über Belastbarkeit und Leistungsfähigkeit der untersuchten Probanden zulassen (Kindermann, 1984). Mit Hilfe eines Stufentests wurde die Leistungsfähigkeit der Probanden bestimmt. Als Richtmaß für die Einteilung in die Leistungsgruppen diente die maximale Sauerstoffaufnahme, bestimmt aus der Spiroergometrie mit einem offenen System. Aus leistungsdiagnostischer Sicht wurden folgende Parameter bestimmt:

- Maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max)
- maximal erreichte Laktatkonzentration (Lac_{max})
- maximale Leistung (P_{max})
- individuelle anaerobe Schwelle (IAS)

Bei dieser Spiroergometrie wurden zudem die Zuordnungsvorschriften zu den zwei Gruppen überprüft, bei denen für die Trainierten eine $\text{VO}_2\text{max} \geq 65 \text{ ml/kg/min}$ und bei den Untrainierten eine $\text{VO}_2\text{max} \leq 50 \text{ ml/kg/min}$ gefordert war. Konnte ein Proband nicht eindeutig einer Gruppe zugeordnet werden, wurde er nicht in die Hauptuntersuchung eingeschlossen.

Zur Vergleichbarkeit der Werte wurden des Weiteren die körperlsgewichtsbezogene Leistung (P_{rel}) und die relative Sauerstoffaufnahme ($\text{VO}_2\text{max/kg}$) berechnet.

Zusätzlich wurde die Leistung bei 80% der IAS bestimmt ($\text{IAS}_{80\%}$), um die Belastungsintensität für die Dauerbelastung festzulegen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die leistungsdiagnostischen Daten im Einzelnen zu erkennen.

Tabelle 3: Darstellung der leistungsdiagnostischen Daten der trainierten und untrainierten Probanden, sowie der Gesamtpopulation. (MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung $\ast=p \leq 0,05$).

	Trainiert (N=20)		Untrainiert (N=17)		Gesamt (N=37)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
VO_2max [ml/min]	4908*	592	3628*	594	4303	873
$\text{VO}_2\text{max/kg}$ [ml/min/kg]	68,3*	4,7	46,3*	3,9	57,9	12,0
P_{max} [Watt]	378*	51	269*	46	327	73
$P_{\text{max/kg}}$ [Watt/kg]	5,2*	0,5	3,4*	0,43	4,4	1,0
IAS [Watt]	277*	58	169*	52	226	77
IAS 80% [Watt]	222*	46	135*	42	181	62

3.4 Dauertest

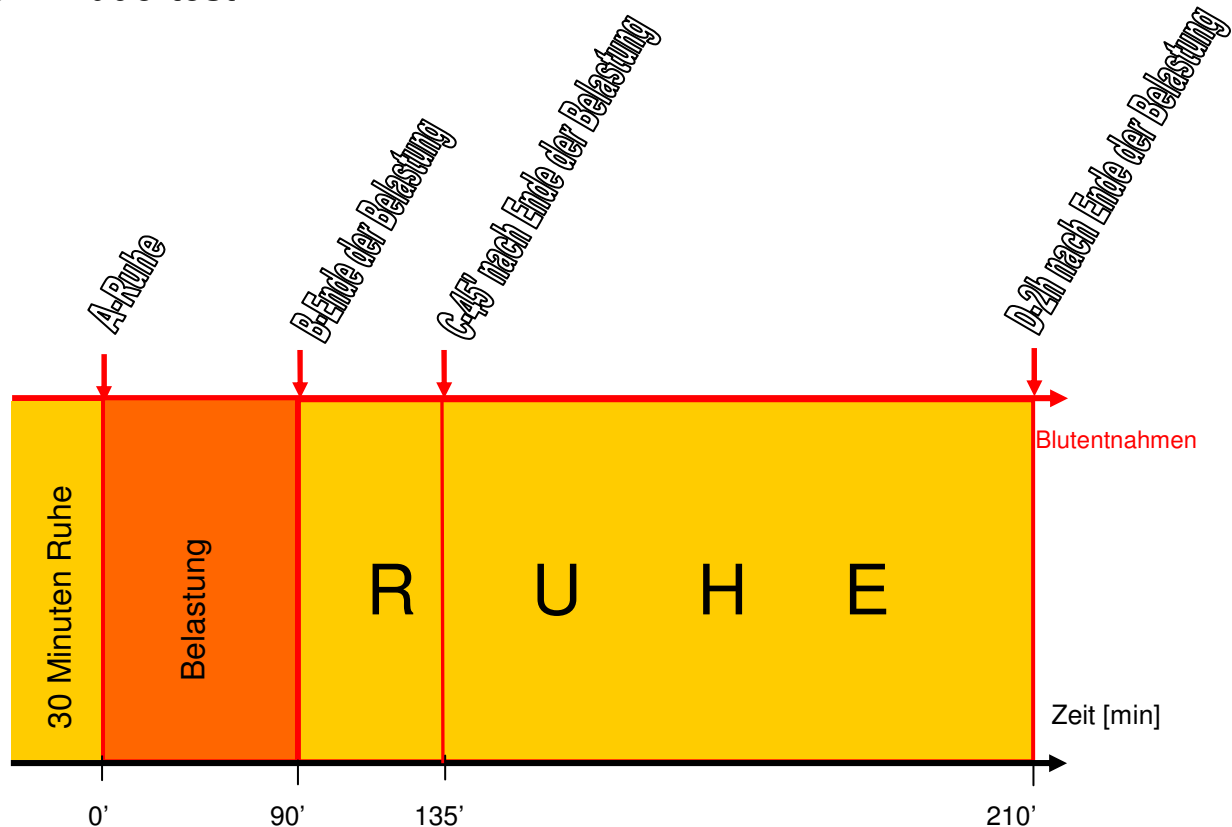


Abbildung 9: schematische Darstellung des Dauertests

Im Abstand von mindestens 7 Tagen und maximal 4 Wochen nach der Gesundheits- und Leistungsbeurteilung wurden diejenigen Probanden, die den Zuordnungsvorschriften der beiden Gruppen entsprachen zum Dauertest eingeladen. Diese Hauptuntersuchung fand bei allen Teilnehmern jeweils vormittags statt und wurde durch eine 30minütige Ruhephase eingeleitet. Nach Eintreffen der Probanden wurden ihnen als erstes eine Flexüle in eine oberflächlich gelegene Vene des Unterarms oder der Ellenbeuge gelegt. Am Ende der Ruhephase wurde das erste Mal aus dieser Flexüle Blut abgenommen. Direkt im Anschluss daran wurde der Proband aufgefordert noch einmal auf Toilette zu gehen und im Anschluss wurde das aktuelle Gewicht gemessen. Danach wurde eine Fahrradergometrie über 90 Minuten bei 80% der IAS (bestimmt aus der vorangegangenen Leistungsbeurteilung) durchgeführt. Während der Belastung wurden nach 20, 40, 60, 80 und 90 Minuten Herzfrequenz, Blutdruck und Laktat gemessen. Es durften in dieser Zeit lediglich maximal 500 ml Wasser aufgenommen werden. Mit Abschluss der 90 Minuten wurde ein zweites Mal venöses Blut über die Flexüle entnommen.

Daraufhin wurde noch einmal das aktuelle Gewicht gemessen und die subjektive Belastungsintensität mit Hilfe der BORG-Skala abgefragt. Der Proband hielt sich nun für eine weitere zweistündige Ruhephase bei uns auf und ihm wurde in dieser Zeit noch zwei Mal venös Blut entnommen, jeweils 45 Minuten und 2 Stunden nach Belastungsende. Während der Ruhephase durfte kein Essen eingenommen, aber eine uneingeschränkte Menge Mineralwasser getrunken werden.

Bei allen vier venösen Blutentnahmen wurden aus dem Blut die immunologischen und hormonellen Parameter bestimmt. Lediglich die Blutentnahmen vor der Belastung und 45 Minuten nach der Belastung wurden zur Bestimmung der molekulargenetischen Parameter herangezogen. Dazu wurden zusätzlich vier so genannte PAXgene Röhrchen abgenommen.

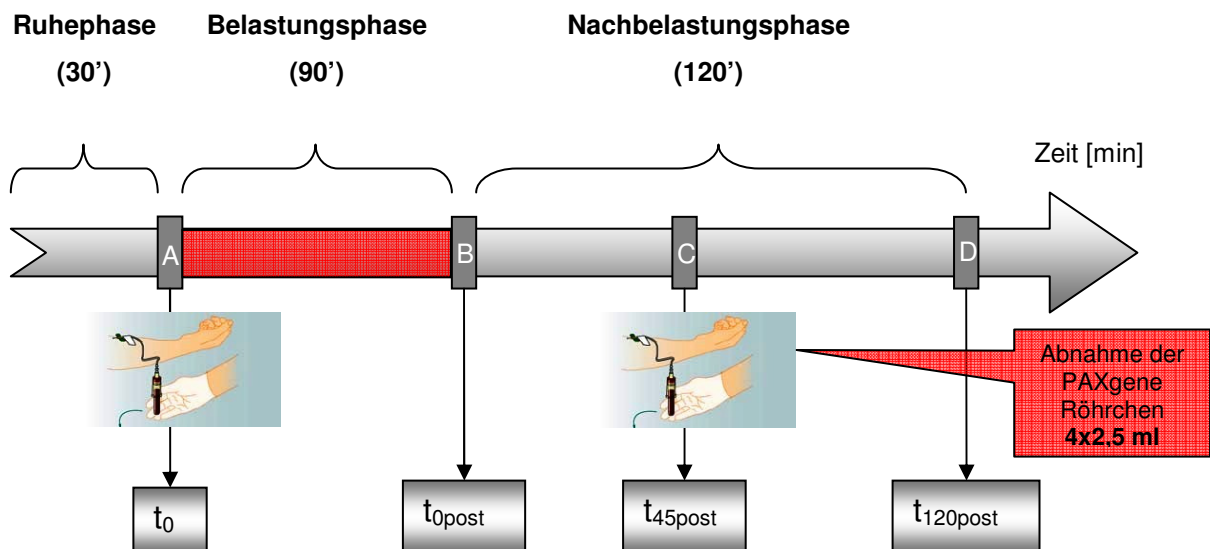


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Dauertests (90 min bei 80% IAS)
Die Blutentnahmen sind mit A, B, C, und D gekennzeichnet, wobei nur bei den Blutentnahmen A und C zusätzlich 4 PAXgene – Röhrchen abgenommen wurden.

3.5 Labor

3.5.1 Probengewinnung und –verarbeitung

Im Dauertest erfolgten venöse Blutentnahmen vor der Belastung, direkt am Ende der Belastung, 45 Minuten und 2 Stunden nach Belastungsende (siehe Abbildung: 9). Dabei wurden Blutproben aus einer Vene der Ellenbeuge, bzw. des Unterarms, bei leichter Stauung (40 mmHg), über eine Flexüle (Sarstedt) entnommen. Bevor ein Proband die 90-minütige Ergometerbelastung absolvierte, erfolgte die erste Blutentnahme (A) nach einer 30-minütigen Ruhephase, die der Proband liegend verbrachte. Nach der Belastung wurde sofort die zweite Blutentnahme (B) im Liegen durchgeführt. Anschließend musste der Proband zwei Stunden im Liegen ruhen. In dieser Zeit war es ihm nicht gestattet Nahrung aufzunehmen, sie konnten jedoch zur Toilette gehen, bei diesen Aktivitäten sollte er sich möglichst wenig bewegen. Die dritte Blutentnahme (C) erfolgte 45 Minuten und die vierte Blutentnahme (D) zwei Stunden nach Belastungsende während der Ruhephase im Liegen. Nach der vierten Blutentnahme durfte der Proband die Einrichtung verlassen.

Zum Zeitpunkt A und C wurden jeweils 11 Röhrchen und zu den Zeitpunkten B und D jeweils 7 Röhrchen abgenommen. Bei jeder Abnahme wurden die Monovetten gut geschwenkt und außer die Serummonovetten und die EDTA – Monovette zur Blutbildanalyse bis zu ihrer Weiterverarbeitung entsprechend ihrem Verwendungszweck auf Eis gelagert.

Tabelle 4: Standardisierte Reihenfolge der Blutabnahmen, Art der Monovetten und Verwendungszweck

Reihen- folge	Monovettenart	ml	geplanter Verwendungszweck
1	Lithium – Heparin - Monovetten	2x 7,5 ml	Katecholamine
2	Serummonovetten	3x 9ml	ELISA (CrP, Interleukine, Cortisolbestimmung)
3	EDTA – Plasma	1x 10ml 1x 2,5 ml	Blutbild und Bestimmung zellulärer Bestandteile
4	PAXgene Blood RNA Tubes	4x 2,5ml	Bestimmung der Genexpression

Um eine fortschreitende Reaktion der Genexpression im abgenommenen Blut zu verhindern wurden die PAXgene Röhrchen der Firma PreAnalytix mit einem patentiertem Gemisch vorgefüllt, welches die RNA-Moleküle vor einer Degradation durch RNase schützt und die Einleitung der Genexpression verhindert. Um zu gewährleisten, dass sich die Zahl der kopierten mRNA in den Proben während der Lagerung bis zur Weiterverarbeitung bei der Firma SIRS Lab sich nicht veränderte, wurde die Probe so schnell wie möglich nach der Abnahme bei -80 °C eingefroren. Die PAXgene Röhrchen wurden dann alle zwei Wochen von einem Mitarbeiter von SIRS-Lab zur Analyse abgeholt.

Lithium – Heparin und die große EDTA – Monovette wurden sofort nach der Abnahme auf Eis gelagert und im Anschluss daran bei 4 °C bei 3250 x g zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge 5810R). Der Überstand wurde in 0,5 ml, mit Hilfe von Eisblöcken vorgekühlte Eppendorf pipettiert und dann sofort bei -80 °C eingefroren.

Die Serummonovetten wurden nach der Abnahme bei Raumtemperatur 30 Minuten stehend gelagert und anschließend bei 20 °C und 4000 x g für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge 5810R). Das abpipettierte Plasma wurde dann in beschriftete 0,5 ml Eppendorfgefäße, die mit Hilfe von Eisblöcken bei -80 °C vorgekühlt waren, portioniert. Nur so konnte ein sofortiges Gefrieren des Plasmas gewährleistet werden. Das so schockgefrorene Plasma wurde bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung, der Durchführung des ELISAs aufbewahrt. Die kleine EDTA-Monovette wurde rollend gelagert und anschließend im Beckmann Coulter AcT diff (Krefeld) gemessen.

Da es infolge von Belastungen zu Plasmavolumenveränderungen kommt, wird die Volumenkorrektur anhand der Veränderung des Hämatokritwertes für alle zellulären Parameter berechnet.

3.5.2 Laktatbestimmung

Alle, sowohl während des Vortests, als auch während der Hauptuntersuchung abgenommenen Laktatwerte wurden aus dem arterialisiertem Blut bestimmt. Dazu wurde das Blut aus dem mit Finalgon hyperämisierten Ohrläppchen mit Hilfe von 20 µl Kapillaren abgenommen und anschließend in entsprechenden Gefäßen mit Stabilisationspuffer gegeben. Die Laktatkonzentration wurde dann enzymatisch durch eine GOD- Amperometrie im Ebio basic (Eppendorf) bestimmt.

3.5.3 Sandwich – ELISA zur Bestimmung von CRP

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration des C-reaktiven Proteins im Blutserum mittels Sandwich – ELISA (Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Dafür wurden monoklonale Coating-Antikörper der Firma Firtgerald Industries International Inc. (Clon Nr. M7111422) und HRP konjugierte Goat anti-Human CRP Detektor-Antikörper der Firma Bethyl Laboratories Inc. (Cat-Nr. A80-125P) eingesetzt. Die Detektion erfolgte auf einem Plattenreader bei 450 nm.

3.5.4 Sandwich Chemilumiszenz-Assay zur Bestimmung von IL-6

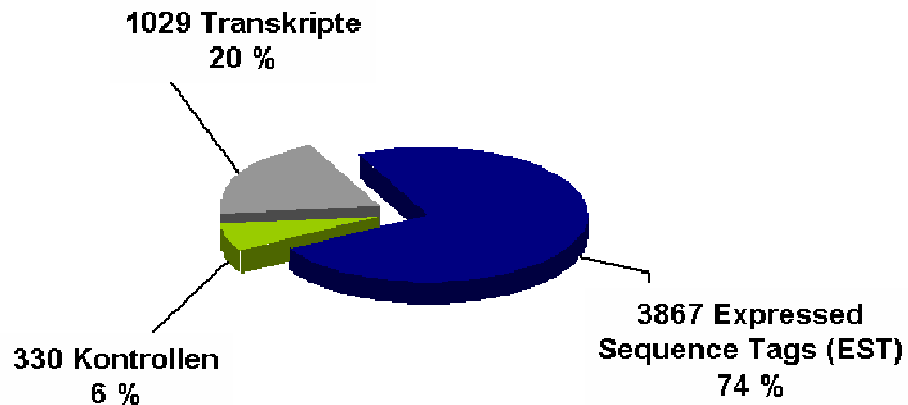
Für die Bestimmung des IL-6 aus dem Blutserum mittels Sandwich Chemilumiszenz-Assay wurde der Access IL-6 Testkitt der Firma Beckmann Coulter eingesetzt. Die Messung der Konzentration von Interleukin 6 (gemessen in pg/ml) wurde mittels des Access Immunoassay Systems (Beckmann Coulter) durchgeführt.

3.6 Mikroarray – Technologie

Im folgenden Abschnitt wird die Mikro-Array Technologie vorgestellt. Im ersten Teil erfolgen eine Beschreibung des Aufbaus des für die Studie verwendeten Biochips, sowie der detaillierte Ablauf aller Arbeitsschritte zur Herstellung der mRNA und der Hybridisierung. Abschließend wird ein Einblick in die Auswertemöglichkeiten und Darstellungsformen der Genexpressionsdaten gegeben.

3.6.1 Array – Design

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mitteldichte-Polynukleotid Array eingesetzt, der von der SIRS-Lab GmbH lediglich für interne Zwecke, wie Forschung entwickelt wurde. Der Mikroarray enthält 4.541 Gene (jedes als Doppelreplikat), die im direkten Zusammenhang mit Inflammations- und Immunreaktionsprozessen stehen. Die Zusammenstellung erfolgte durch systematische Analysen komplexer Hybridisierungen auf Hochdichtemembranfiltern (22x22 cm Nylon Membranen, UniGene Set II RZPD), auf welchen insgesamt 74.000 einzelne menschliche cDNA-Klone lokalisiert waren.



Aktualisierung der Sonden mittels öffentlich zugänglichen Datenbanken und biologische Klassifikation der Gensonden

Abbildung 11: Klassifikation der eingesetzten Mikroarrays.

Die hier zur Anwendung gekommenen Mikroarrays zählen zu den mit langen Oligonukleotiden besetzten Mikroarrays. Die Oligonukleotide haben eine Länge von 56-70 bp.

Der aus 28 Untereinheiten bestehende Mitteldichtearray, ist jeweils aus 15x15 Spots zusammengesetzt. Die horizontalen Linien dieses Blocks werden Reihen genannt und sind von links nach rechts nummeriert. Die vertikalen Linien werden als Spalten bezeichnet und sind von oben nach unten nummeriert.

Im 1., 4., 14., 15., 25. und 28. Subarray sind Kontrollelemente in den Diagonalen der Blocks angeordnet. Gebiete am unteren Rand jedes Subarray sind durch eine durchgezogene Linie abgegrenzt und beinhalten leere Positionen, die frei von DNA sind.

Der Satz der Kontrollelemente, des Mitteldichtearrays, beinhaltet folgende Spots: leere Positionen, Puffer-Spots, und die folgenden Nukleinsäuren: universelle menschliche DNA, Cot-1 DNA, polyA DNA, DNA von 3' und 5' Teilen der menschlichen β -Aktin Gensequenz, DNA der acht Plasmid-Vektoren und DNA aus Fragmenten von 10 Spike Gensequenzen. Die Position und Gruppierung der Kontrollelemente ist so ausgewählt, um die Qualität der Daten-Analyse zu erhöhen. Aufgrund der räumlichen Anordnung der Kontrollelemente bei der Hybridisierung ist einen genauer Check des Spottingprozesses, der Blockierung und der Hybridisierungseffizienz, sowie des „signal-to-noise“- Verhältnisses innerhalb eines

jeden Subarrays, zwischen den einzelnen Subarrays und über das gesamte Array möglich.

Auf einem Mitteldichtearray existieren positive und negative Kontrollelemente. Diese Kombinationen gewährleisten eine korrekte Interpretation und eine sichere Zusammenfassung der Ergebnisse Genexpressionsanalyse.

Positive Kontrollelemente enthalten: Spots der 5'-End Cy3-gelabelten „Alien“-nukleotide ohne signifikanter Homologie zu einer menschlichen kodierten Sequenz, Spots für Proben aus unterschiedlichen Regionen des 3'-Endes von menschlichen β -Aktin Genen, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene und Gene für zwei Isoformen des menschlichen Tubulin alphas.

Negative Kontrollelemente enthalten: leere Spots, Pufferspots, Spots, die menschliche Cot-1 DNA enthalten, Spots die Polynukleotide enthalten, die aus einer Sequenz von zehn E.coli - Plasmiden und Plasmidvektoren gewonnen wurden und deren Marker, welche keine Homologie mit menschlichen Sequenzen aufweisen.

Kontrollelemente mit speziellen Funktionen: Spots, die DNA Fragmente von zehn Arabidopsis thaliana Genen repräsentieren, die kurz als Ara 1 – Ara 10 bezeichnet werden. Sie werden ausgewählt, aufgrund des Fehlens jeglicher signifikanter Homologie in ihrer Sequenz zu menschlichen Genen. Folglich scheinen sie, abhängig vom experimentellen Design, zwei Funktionen inne zu haben:

- a) Critical control point (CCP): für die Durchführung bei jeder Phase oder während kritischer Schritte der Hybridisierung, wenn korrespondierende mRNAs zu den Proben (Spike controls) zugegeben wird.
- b) Negative Kontrollen, für den Fall, dass diese mRNAs im Assay fehlen.

Außerdem gibt es Spots die Polynukleotide von 24 annotierten Genen enthalten, die ihre RNA Expressionsrate bei den meisten in vitro und in vivo untersuchten biologischen Systemen auf einem konstanten Level halten und deren Reaktion auf störende Einflüsse („house-keeping“-Gene). Spots die Polynukleotide für 16 menschliche Gene enthalten, die verschiedene alpha- und beta-Ketten zwischen dem Major histocompatibility complex II Receptors und den CD-Markern verschlüsseln. Die CD-Marker dienen zur Spezifizierung definierten Sets und Subsets der Leukozyten (Oberflächenmarker).

3.6.2 Der Spottingprozess

Das Spotting beschreibt ein robotergesteuertes Kontaktverfahren, bei dem Polynukleotidsonden auf einen modifizierten Glasobjektträger aufgetragen werden. Unter geeigneten pH-Bedingungen gehen die 55 – 70 bp langen Oligonukleotide eine kovalente Bindung mit der EPOXY – Silan Gruppe auf der Oberfläche des Glasobjektträgers ein. Die Bindung erfolgt dabei über einen Linker auf der Glasoberfläche.

Die Produktion der Mikroarrays ist ein computergesteuertes Verfahren, das einer ständigen Überwachung bedarf. Die Einhaltung definierter äußerer Bedingungen ist unabdingbar. Es bedarf einer staubfreien Atmosphäre, sowie einer Temperatur von konstant 20°C und einer Luftfeuchte von 60% während des gesamten Prozesses, um die Qualität und Homogenität der Spots zu gewährleisten.

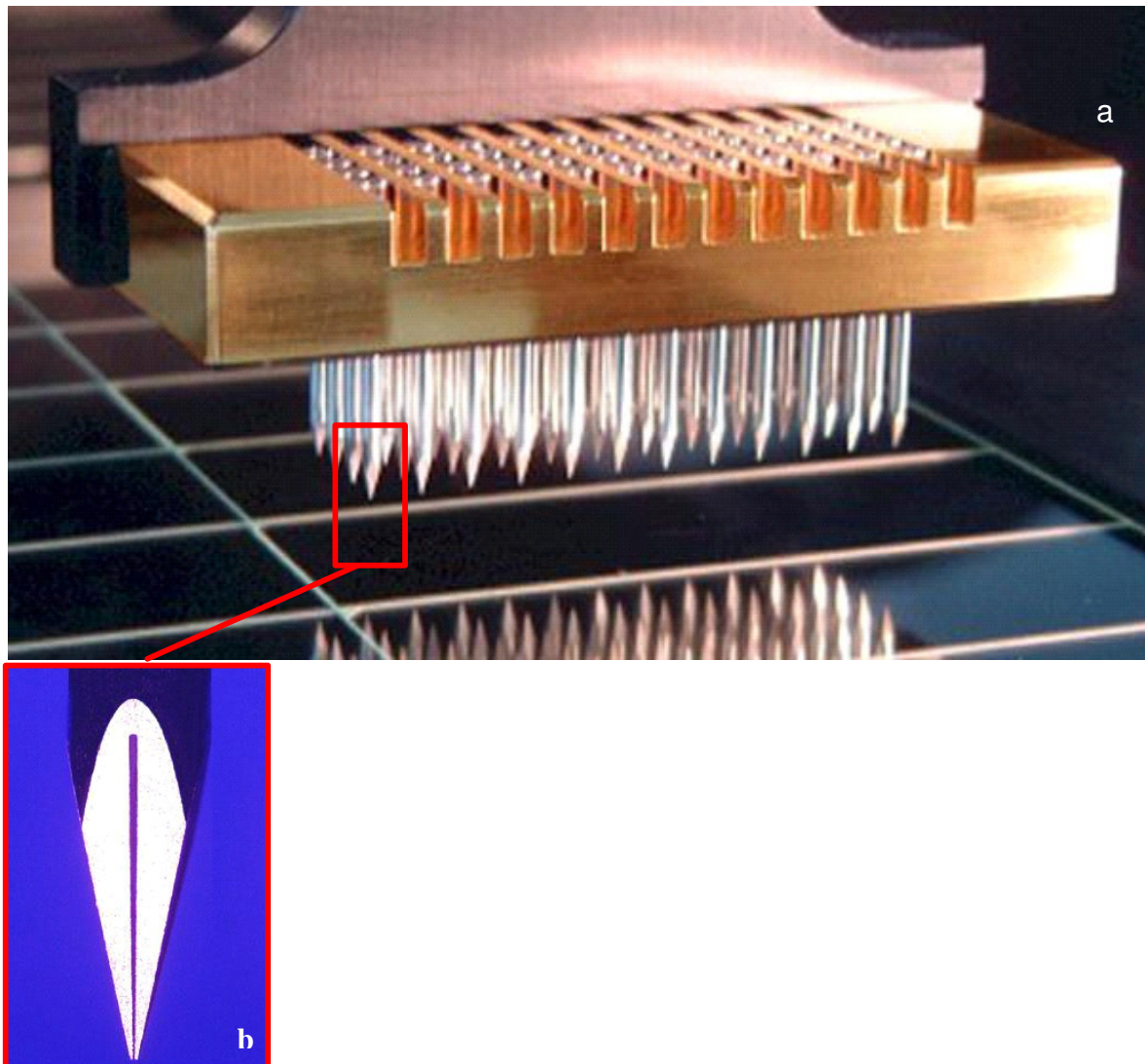


Abbildung 12: a) Vergrößerte Ansicht der Pinhalterung des 48er Pinsets; b) Vergrößerter Spotting Pin mit seitlichem Spalt

Auf die Chipoberfläche werden die Oligonukleotide mit Hilfe von so genannten Pins aufgetragen. Diese Pins ähneln kleinen Nadeln, die einen 50 μm kleinen Spalt aufweisen. Beim Eintauchen der Pins in die Oligonukleotidlösung wird ein Volumen von 25 μM aus Oligonukleotiden und Spottingpuffer infolge der Kapillarkräfte in den Pin aufgenommen und anschließend auf den Objektträger gespottet (ca. 1 pl pro Spot). Der Spotdurchmesser beträgt ca. 110 μm (75-200 μm).

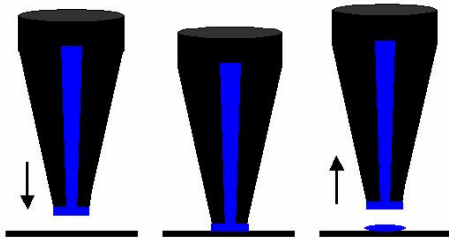


Abbildung 13: Spottingverfahren.

Die Pins sind mit einem flachen Boden ausgestattet, welcher durch leichtes Aufsetzen auf der Oberfläche einen Flüssigkeitstropfen hinterlässt. Der Pin arbeitet wie ein Druckverfahren (Abwärtshub, Aufsetzen, Aufwärtshub).

3.6.3 Arbeitsschritte bis zur Hybridisierung des Mitteldichte-Arrays

Das Probenaufarbeiten erfolgte bei unserem Kooperationspartner bei der SIRS-Lab GmbH Jena, einem zertifizierten Labor, nach strengen Richtlinien (ISO 9001) und beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

1. Isolation der RNA
2. Reverse Transkription
3. RNA Hydrolyse
4. Reinigung der cDNA
5. Labeling – Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen
6. Reinigung der Proben
7. Hybridisierung und Waschschrte
8. Scannen der Hybridisierungssignale

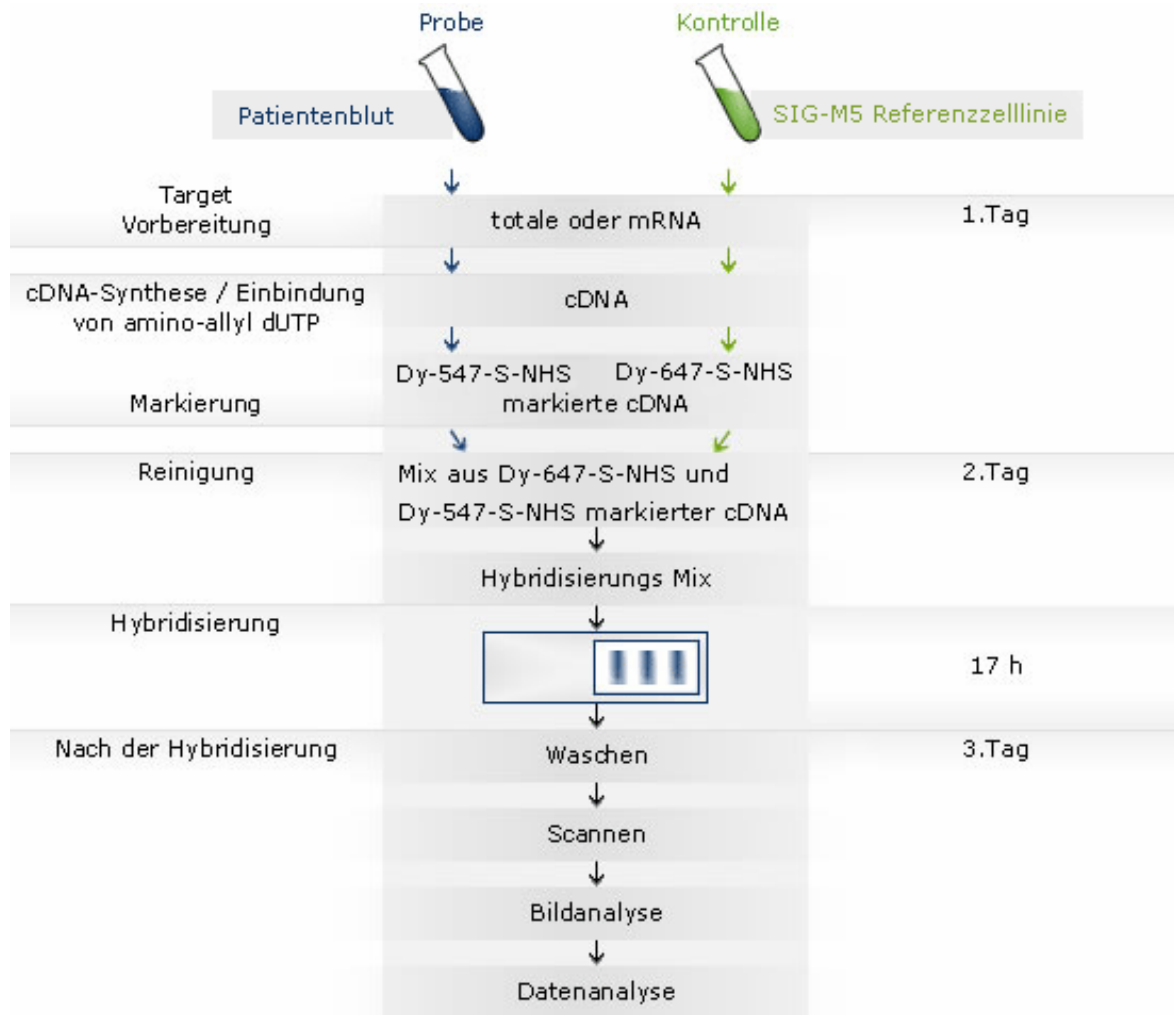


Abbildung 14: detaillierter Ablauf des Mikro-Array Experiments

1. PAXgene™ Blood RNA Kit

Einer der ausschlaggebendsten Schritte bei Mikroarray – Experimenten ist die RNA-Isolierung, da RNA nicht annähernd so stabil ist wie DNA. RNA und insbesondere mRNA ist durch ubiquitär vorhandene RNase ständig vom Zerfall bedroht, aus diesem Grund ist auf eine sehr saubere und RNase-reduzierte Umgebung zu achten. Unter der Verwendung eines „PAXgene Blood RNA Kits“ (Qiagen) wurde die totalRNA entsprechend der Anleitung des Herstellers aus dem in den PAXgene Blood RNA Tubes enthaltenem Vollblut isoliert.

Bis zur Isolierung wurden die Proben bei -80° C gelagert. Zur Isolierung wurden zunächst 5 µl der Spike 1 Lösung (100fach verdünnt) auf die angetaute Probe gegeben, die dann über Nacht bei -4°C im Kühlschrank verblieb. Spike 1 besteht aus synthetischer RNA, aus *Arabidopsis thaliana*, und dient als interne Kontrolle für die exakte Ausführung der RNA Isolation.

Am darauf folgenden Tag wurde die Probe vor der Weiterverarbeitung 2h stehengelassen und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend kam es durch eine 10minütige Zentrifugation bei $3.220 \times g$ zur Bildung eines Pellets im Tube. Für die nachfolgenden Waschschrte wurde lediglich das verbleibende Pellet eingesetzt.

Zunächst wurde der Überstand (Supernatant) abgegossen, nach Zugabe von 5ml RNase freiem Wasser, Vortexen und Zentrifugieren (10min, $3.220 \times g$) wurde der Überstand erneut verworfen. Danach wurden 375 μ l BR1, ein Resuspensionspuffer, zur Auflösung des Pellets zugegeben und nach kurzem Vortexen in ein frisches 1,5ml Mikrozentrifugentube überführt. Zur Einleitung der Zelllyse und um die Verdauung der Proteine zu gewährleisten wurden 40 μ l Proteinkinase K, sowie 300 μ l BR2 (Bindungspuffer), nacheinander hinzugefügt, gemischt und 30 min bei 55°C , 1.400 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach dem Erhitzen erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei $16.000 \times g$, um die verbliebenen Zell- und Proteinrümmer zu entfernen. Um die Bindungskonditionen zu optimieren wurde nachfolgend der Überstand mit 350 μ l 100%igen Ethanol versetzt. Das Lysat (700 μ l) wurde auf die Säulen (PAXgene Kit) gebracht und kurz bei 10.200 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, da die Säulen das Volumen des Ethanolgemisches nicht mit einem Mal aufnehmen können. Die RNA bindet selektiv in der Silicia-Gel Matrix der Säule, während Kontaminanten die Säule passieren.

Es folgten zwei Waschschrte, die dafür sorgten, dass die Membran von restlichen Kontaminanten bereinigt wird. Der erste Waschschrte erfolgte durch die Zugaben von 350 μ l BR3-Puffer auf die Säule und Zentrifugation bei 10.200 rpm für 1 Minute. Aus 10 μ l DNase Stammlösung (RNase-Free DNase Set(50), Qiagen) und 70 μ l RDD Puffer wurde eine Lösung hergestellt und direkt auf die Säulen pipettiert, so dass nur noch vorhandene DNA abgebaut wird. Der zweite Waschschrte erfolgte wieder mit 350 μ l BR3-Puffer nach einer 45minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Zentrifugation bei 10.200 rpm für 1 Minute. Im Anschluss erfolgten weitere zwei Waschschrte mit jeweils 500 μ l BR4-Puffer und Zentrifugation 1 min bei 10.000 rpm und abschließend 3 min bei 16.000 rpm. Die Säule wurden nun auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 sec bei 16.000 rpm trocken zentrifugiert. Die RNA wurde schließlich zweimal mit 40 μ l BR5-Puffer (1 min, $< 10.000 \text{ rpm}$ Zentrifugation) in ein RNase freies Reagenzgefäß eluiert. Das Eluat wurde bei 65°C für 5 min in einem Heizblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Probe bei -70°C im

Tiefkühlschrank aufbewahrt. Der Puffer BR5 verhinderte die Verknäulung der beinhaltenden RNA.

Aus 2,5ml Vollblut konnten 4-20 µg total RNA isoliert werden. Zur weiteren Anwendung mit einem Biochip sollte die isolierte RNA möglichst intakt, frei von Verschmutzungen und von ausreichender Qualität sein. Zur Kontrolle der isolierten RNA, wurde 1 µl RNA Eluat am Spektrophotometer (NanoDrop®) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in ng/µl. Zur Kontrolle der Qualität bzw. Reinheit und Sicherstellung einer erfolgreichen Isolierung der RNA wurde abschließend eine Gelelektrophorese mit einem 1,2%igen Agarose-Gel durchgeführt. Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um unterschiedlich große Moleküle zu trennen. Dabei wandert eine Mischung der zu trennenden Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Felds durch ein Gel, welches sich in einer ionischen Pufferlösung befindet. Auf Grund der Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Die negativ geladene RNA wandert von der Kathode zur Anode und wird nach ihrem Molekulargewicht in ribosomale RNA 28S- und 18S-Einheiten aufgetrennt. Zur Auswertung des Gels nach der Elektrophorese werden die zu trennenden Moleküle nach der Elektrophorese mit Farbstoffen wie beispielsweise Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Das Gel befand sich 30 min vor der Gelelektrophorese im Laufpuffer. Der Gelansatz enthielt 6 µl (200 – 500 ng) gesamt-RNA und 4 µl 5x Gelladepuffer und wurde bei 65°C für 5 min inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 45 min durchgeführt und mittels Gel Doc 2000 (BioRad) analysiert. Für die weitere Verarbeitung wurden jeweils 10 µl RNA aliquotiert und im Tiefkühlschrank bei -80° C aufbewahrt.

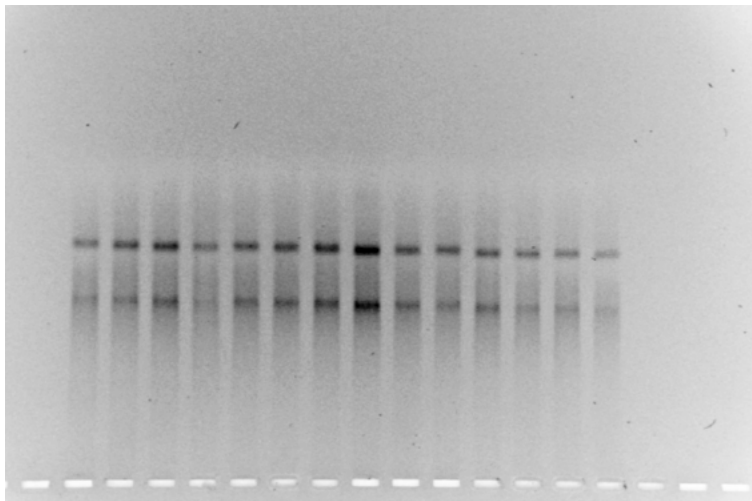


Abbildung 15: Ergebnis der Elektrophorese

Auswertung der Elektropherogramme

Mit Hilfe des Elektropherogramms konnten die ribosomalen Banden 18S-RNA (1,9 kb) und 28S-RNA sichtbar gemacht werden. Die beiden Peaks von 28S und 18S sollten in einem Verhältnis $> 1,8$ zueinander stehen. Der Peak von 18S sollte in diesem Fall immer kleiner als der Peak von 28S sein. War dies der Fall, so konnten zwei hochqualifizierte RNA Banden gezeigt werden (siehe Abbildung: 12). Befanden sich kleine RNA-Fragmente zwischen den ribosomalen Banden bzw. unterhalb der 18S-Bande, ist die RNA degradiert und/oder kontaminiert.

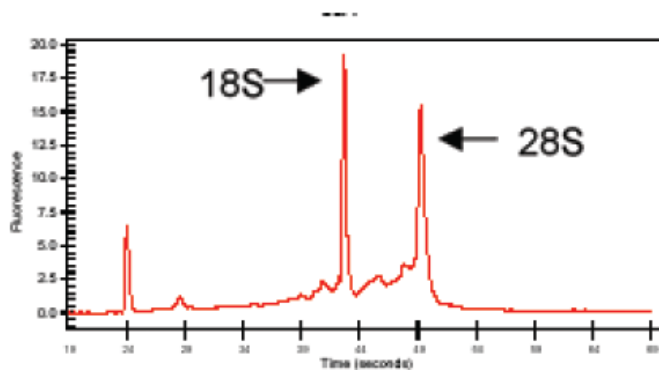


Abbildung 16: Peaks und ribosomale Banden aus der Elektrophorese
(Quelle: http://peqlab.de-91-ND-1000_an.pdf)

2. Reverse Transkription

In diesem Schritt wurde die zuvor isolierte totalRNA in cDNA umgeschrieben, dabei wird die dTTP-Gruppe unter Einbau einer Aminoallyl(AA)gruppe zu AA-dUTP. Bei dieser Umschreibung wurden weitere Arabidopsis-Gene mRNAs (mRNA Spike 2-8) der Probe und der Kontrolle zugegeben, um später kritische Kontrollpunkte zu haben, welche die Streubreite des Fluoreszenzsignals anzeigen. Um die Effizienz des Prozesses zu überwachen, wurden zusätzlich synthetische mRNA-Fragmente (Spike 9 und 10) mitgeführt. Sie sind positive Kontrollen, die alle Schritte der Reversen Transkription mit durchlaufen.

Die Patientenproben enthielten jeweils 6 µg lypholisierte RNA, die in je 13,5 µl RNase freiem Wasser (DEPC) gelöst wurden. Die Kontrollproben wurden auf ebenfalls 6 µg eingestellt. (Bei Limitation der Patienten RNA, wurde die Kontrolle auf die jeweilige µg-Menge der Patienten RNA herabgesetzt, damit Kontroll- und Patienten-RNA im gleichen Verhältnis stehen.) Die Spike mRNAs sowie die oligo-dT Primerlösung (2,5 µg/µl) wurden mit DEPC-Wasser verdünnt.

Im ersten Teil der Reversen Transkription wurde die RNA mit kurzen Oligonukleotiden inkubiert [Oligo-dT primer T18V (Sequence 5' to 3' TTTTTTTTTTTTTTTTTTV) 3' Wobble], die mit den Poly(A)-Enden der mRNA hybridisieren. Daraufhin entstanden Matrizen mit Primern, die den Startpunkt des Enzyms der Reversen Transkriptase darstellen. Dabei sollten die Poly(T)-Primer am 5'-Ende ein Wobble, d.h. mit einer anhängenden Base Adenin (A), Guanin (G) oder Cytosin (C), an das 3'-Ende des Transkriptes der Matrize binden, um einen sicheren Startpunkt der Transkription zu gewährleisten.

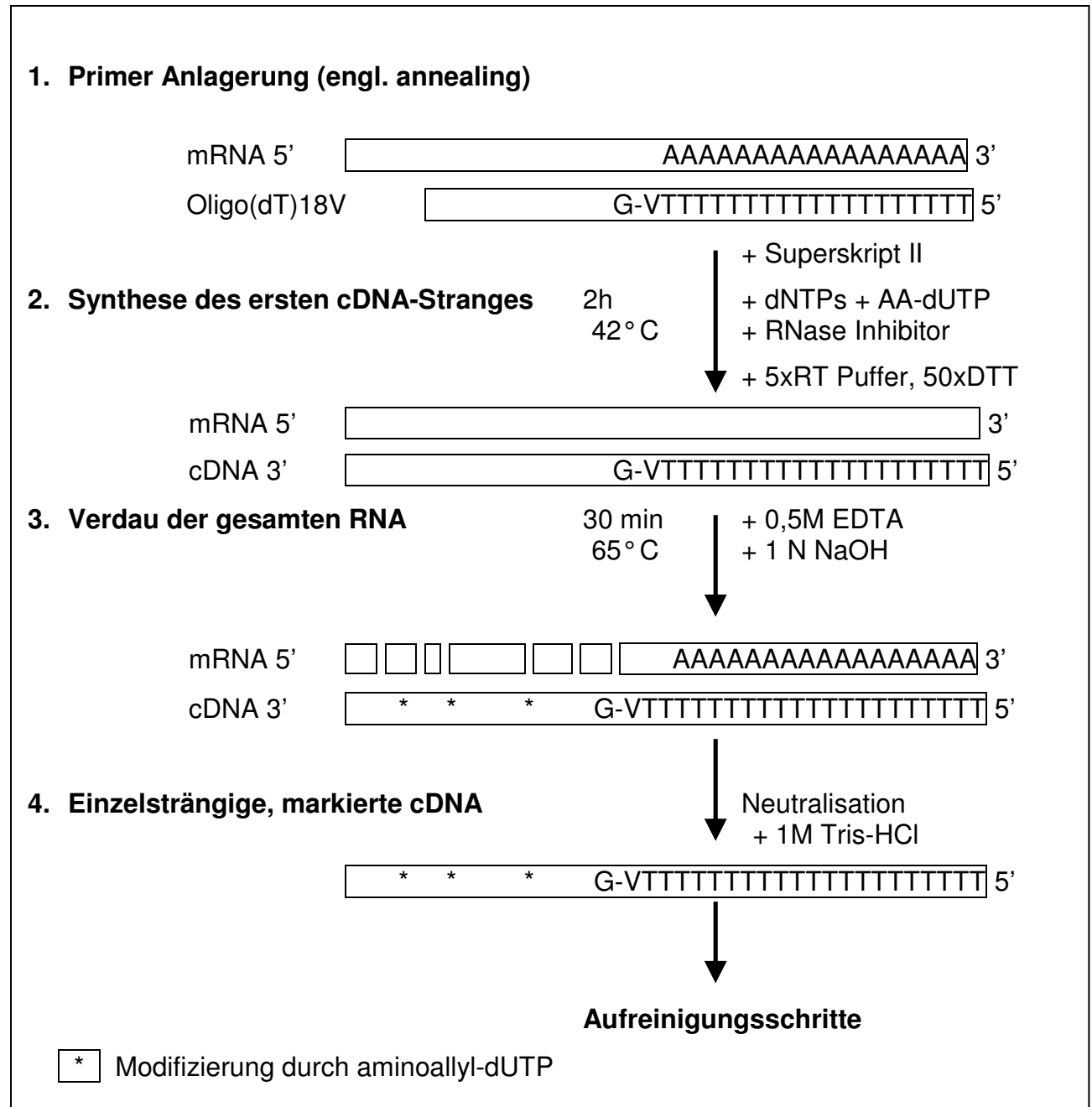


Abbildung 17: Reverse Transkription und gleichzeitige Modifizierung

Während der cDNA-Synthese wurden 80% der dTTP Menge im mRNA-Strang durch AA-dUTP substituiert. Die eingebaute AA-dUTP Gruppe bildete die Voraussetzung für das Labeling, bei dem sich die Farbstoffe an die Aminoallylgruppe anlagern.

Für die Reverse Transkription wurden 13,5 µl Probe (6 µg) und 10 µl Kontrolle (6 µg). Für die eine Probe und eine Kontrolle (Sig-M5 RNA) wird ein Reaktionsansatz für 6 µg totalRNA angesetzt:

- µl Oligo(dT) (2,5 µg/µl)
- Spike Mix jeweils für Probe und Kontrolle
- RNase freies Wasser (auf 18 µl auffüllen)

In den Alien-Spikes waren unterschiedliche Anteile von Spike 2, 4, und 8 enthalten.

Tabelle 5: Ansatz Alien Spike Mix

Alien mRNA	2	1 : 10.000
	4	1 : 1.000
	8	1 : 100

Alien mRNA	Verdünnung	Cy3-Mix 1x	Cy3-Mix 100x	Cy5-Mix 1x	Cy5-Mix 100x
2	1:10.000	1,0 µl	100,0 µl	1,0 µl	100,0 µl
4	1:1.000	1,0 µl	100,0 µl	0,5 µl	50,0 µl
8	1:100	0,5 µl	50,0 µl	1,0 µl	100,0 µl
Gesamt		2,5 µl	250,0 µl	2,5 µl	250,0 µl

Der hergestellte Reaktionsansatz wurde gemischt und anschließend bei 70° C für 10 Minuten inkubiert. Danach kühlten die Proben und die Kontrollen für 5 Minuten auf Eis. Folgender Ansatz wurde anschließend zu den Proben und Kontrollen pipettiert:

Tabelle 6: Pipettieransatz für die Proben, Kontrollen und Spikes für die cDNA-Synthese

Bestandteile	Proben	Kontrollen
5x RT Puffer	6,0 µl	6,0 µl
50x dNTP	0,6 µl	0,6 µl
0,1 M DTT	3,0 µl	3,0 µl
RNase Out	0,4 µl	0,4 µl
Superscript II	2,0 µl	2,0 µl
RNase freies Wasser	-	-
Endvolumen	12 µl	12 µl

Proben und Kontrollen wurden anschließend 2 Stunden bei 42° C inkubiert.

3. Hydrolyse des Doppelstranges

Der folgende Arbeitsschritt diente der Auflösung des gebildeten Doppelstrangs und des Verdaus der mRNA. Um die reverse Transkriptionsreaktion zu stoppen, wurde den Reaktionsgemischen 20 µl 0,5 M EDTA zugegeben und vermischt. Nachfolgend wurde der Probe 1N NaOH (20 µl zu Probe und Referenzprobe) zugefügt und nach

einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 65° C auf dem Heizblock bewirkte dies eine Zersetzung der RNA. Die Proben wurden durch 1M Tris HCL (pH 7,4) (50 µl zu Probe und Referenzprobe) neutralisiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Volumen von 500 µl mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) aufgefüllt. In Folge der alkalischen Hydrolyse wurden die entstandenen mRNA/cDNA Duplexe in einzelsträngige cDNA hydrolisiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der cDNA, da sich Tris HCL an den Aminogruppen befanden, an die beim Labeling auch Farbstoffe binden konnten und dies hätte das Ergebnis der Farbreaktion manipulieren können.

4. Reinigung der cDNA

Die Reinigung erfolgte mittels Microcon YM-30 Säulen. Die Proben wurden dazu jeweils auf eine Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammelte sich das doppelt destillierte Wasser mit Tris HCL und NaOH am Boden des Reaktionsgefäßes, die cDNA dagegen blieb auf dem Filter liegen, weil die Porengröße für sie zu klein war. Der Durchfluss wurde entfernt und der Waschschrift zweimal wiederholt, jeweils mit Zugabe von 450 µl ddH₂O. Die auf dem Filter liegende, sich noch in wässriger Lösung befindende cDNA löste sich durch erneute Zentrifugation (max. Geschwindigkeit, 3 min), indem der Microcon YM-30 Filter vor dem Zentrifugieren umgekehrt in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt wurde. Die cDNA befand sich nun gereinigt in dem neuen Reaktionsgefäß. Als Eluat erhielt man aufgereinigte einzelsträngige cDNA in einem Volumen von ca. 20 – 40 µl, die in der Speedvac lyophilisiert wurde.

5. Labeling

Fluoreszierende Farbstoffe wurden eingesetzt, um die Hybridisierungssignale zu detektieren. Zur Markierung der aminomodifizierten DNAs wurden Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Dyomics verwendet. Sie besitzen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel verschiedene Absorptions- und Emissionsspektren.

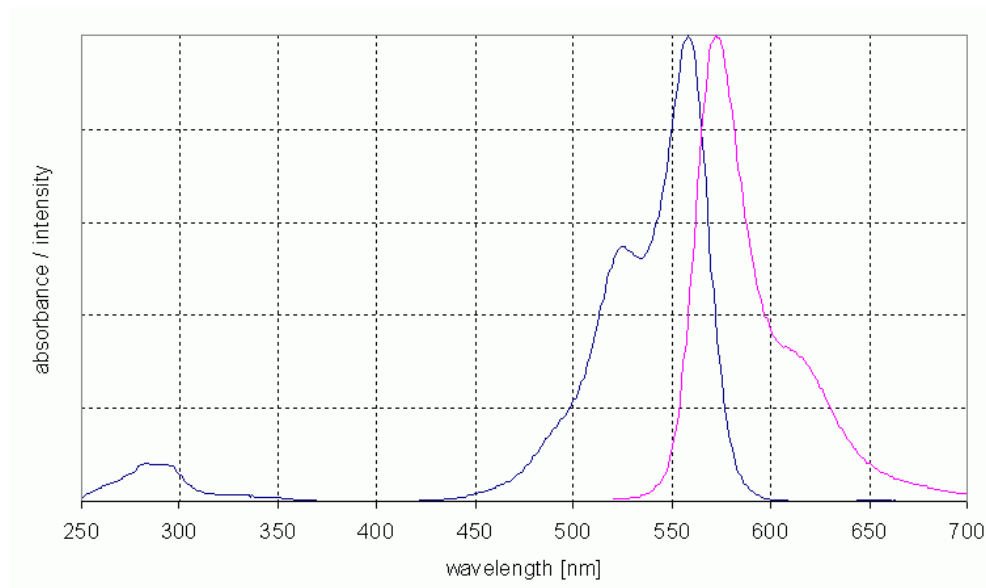


Abbildung 18: DY-548-NHS

Emissionsspektrum bei 558 nm und 572 nm (in Ethanol); molare Absorption: 150.000 M⁻¹cm⁻¹; molares Gewicht: 851,89 g·mol⁻¹. Der Farbstoff emittiert grünes Licht. Strukturformel von DY-548-NHS: C₃₅H₃₉N₃O₁₃S₃Na₂

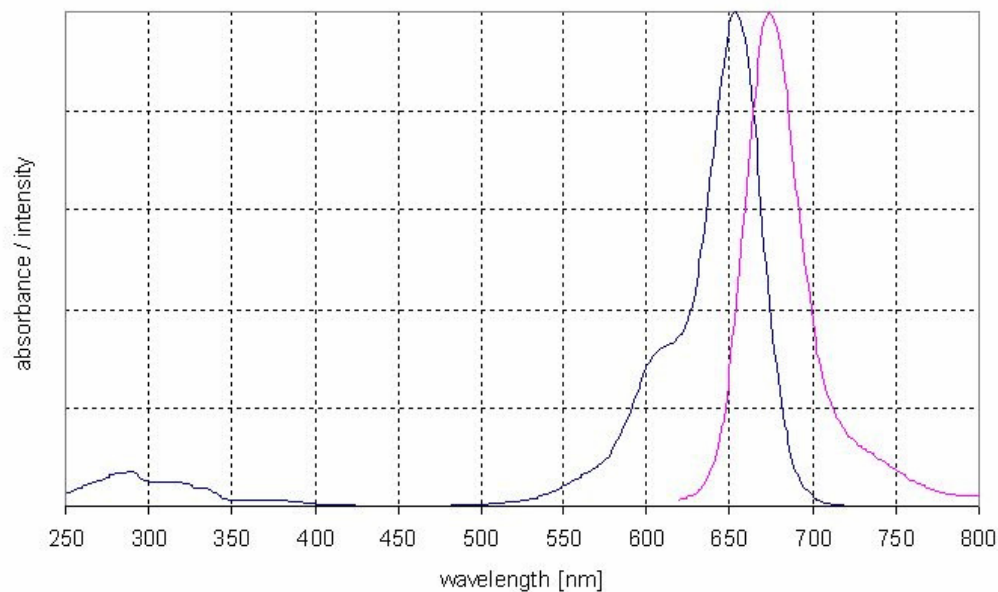


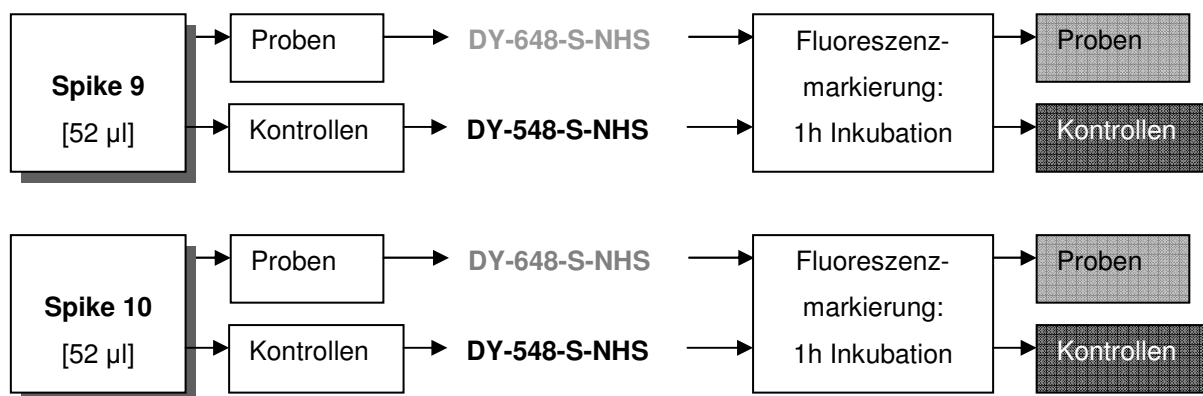
Abbildung 19: DY-648-NHS

Emissionsspektrum bei 653 nm und 674 nm (in Ethanol); molare Absorption: 250.000 M⁻¹cm⁻¹; molares Gewicht: 877,92 g·mol⁻¹. Der Farbstoff emittiert rotes Licht. Strukturformel von DY-648-NHS: C₃₇H₄₁N₃O₁₃S₃Na₂

Die Farbstoffe koppelten sich chemisch an die eingebauten AA-dUTPs. Wie viele Farbmoleküle sich pro cDNA-Molekül anhefteten, hing sowohl von der Länge, als auch von der Sequenz der cDNA ab. Quantitative Vergleiche von gemessenen Intensitäten ließen sich nur zwischen identischen cDNA Sequenzen ziehen, da nicht bekannt ist, welche Farbstoffmengen in cDNA Molekülen eingebaut werden kann.

Die eingesetzten aminoreaktiven Farbstoffe (DY-548-NHS und DY-648-NHS) gingen mit Biomolekülen kovalente Bindungen ein. Bei einem pH-Wert zwischen 8 und 9 reagieren die NHS-ester (N-Hydroxysuccinimidyl-ester) der Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch mit den Aminogruppen am N-terminus der cDNA. Unter leicht alkalischen Bedingungen bilden sich kovalente Bindungen zwischen dem Farbstoff und der Aminogruppe der cDNA aus. Es entstanden fluoreszenzmarkierte cDNA-Moleküle unter Abspaltung von N-Hydrox-Succinimid.

Abbildung 20: Reaktion der NHS-Ester mit den Farbstoffen



6. Reinigung der Proben

Die Proben und die zugehörigen Kontrollen wurden mit jeweils 80 µl H₂O und 100 µl Membran-Binding-Solution zusammen pipettiert und mittels Promega Kit (10.000 x g, 1 Minute) aufgereinigt. Die Binding Solution ist eine Salzlösung und bewirkte, dass die cDNA an der Säule haften bleibt. Es folgten zwei Waschschrte mit Zugabe von 700 µl und 500 µl Waschsolution und anschließender Zentrifugation (700 µl: 10000 x g, 1min; der Durchlauf wird verworfen; 500 µl: 10000 x g, 5min). Im Anschluss wurden die Säulen für 1 min bei 16.000 x g trocken zentrifugiert, danach die Säulchen auf ein frisches Tube gesetzt und anschließend zweimal mit 50 µl H₂O (je 1 min, 10.000 x g) eluiert.

Mittels Messungen am Spektrophotometer (Nanodrop®) wurde der Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe sowie die Konzentration der cDNA überprüft.

7. Hybridisierung und Waschschrte

Zunächst wurden 10 µl Cot-1 human cDNA, zu dem aus der Reinigungsreaktion entstandenen 100 µl cDNA, Eluat pipettiert. Durch die Zugabe von 400 µl ddH₂O zu dem cDNA-Gemisch und anschließender Verwendung eines Microcon YM-30 Filters, entstand ein konzentriertes cDNA-Gemisch (cDNA/Cot-1DNA). Die cDNAs blieben während der Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) auf dem Filter liegen. Durch Umdrehen des Filters in eine frisches Reaktionsgefäß und erneutes Zentrifugation (max. Geschwindigkeit, 3min) wurde das konzentrierte cDNA-Gemisch gewonnen. Das Endvolumen des cDNA/Cot-1-DNA-Gemisches sollte 32 µl betragen.

Das fluoreszenzmarkierte cDNA/Cot-1-DNA-Gemisch (32 µl) wurde mit 58 µl Hybridisierungspuffer (siehe Tabelle: 7) versetzt.

Tabelle 7: Die Hybridisierungslösung für eine Probe

Bestandteile der Hybridisierungslösung	Volumina
Formamid	21,60 µl
20x SSC	15,66 µl
10% SDS	2,70 µl
Hefe-t-RNA/polyA-Mix (je 10,0 µg/ µl)	14,40 µl
RNase freies H ₂ O	3,64 µl

Die Hybridisierungssonde wurde 3 min bei 98°C denaturiert und nach kurzer Zentrifugation wurde das Gemisch in die Hybridisierungskammern der TECAN HS400 - Hybridisierungsstation einpipettiert. Formamid setzt die Schmelztemperatur des Hybrids herab und verhindert die Verknäulung der DNAs, SSC ist ein Salz und SDS ist ein Detergenz, welches dafür sorgt, dass der Glasträger bei der Hybridisierung gut benetzt wird. Der Hefe-t-RNA/polyA-Mix besetzt freie Bindungsstellen, so dass während der Hybridisierung Kreuzhybridisierungen minimiert bzw. unterdrückt werden und somit beim späteren Scannen das nicht Signal verfälschen. Die PolyA-RNA bindet dabei an die nichtabgedeckten T-Enden der cDNA und die Hefe-t-RNA blockiert alle unspezifischen Sequenzen.

Kontrollzelllinie für den Hybridisierungsprozess

Die Zelllinie SIG-M5 wurde aus Knochenmark eines Patienten mit akuter myeloider Leukämie monozytischen Ursprungs isoliert. Die SIG-M5 Zellen sind Suspensionszellen, die unter kontrollierten Bedingungen kultiviert werden, um eine standardisierte RNA zu extrahieren und diese als Referenz (Kontrolle) für die Hybridisierung auf den Mitteldichtechips zu verwenden ("Information Sheet for Cell Lines", April 2001).

Die Morphologie der SIG-M5 Zellen zeichnet sich durch große runde Zellen aus, die einzeln in der Suspension wachsen. Für ein optimales Wachstum der Zellen sorgt 80% Iscove's Medium und 20% fötales Rinderserum (FBS) bei 37° C und 5% Kohlendioxidanteil. Die Lebensfähigkeit der Zellen liegt während der Zellkultivierung bei 70% ("Information Sheet for Cell Lines", April 2001). Zum Zeitpunkt der Ernte beträgt die maximale Dichte der Zellen ca. 2×10^6 Zellen/ml welche zur Gewinnung der gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Midi Kit (Qiagen) dienen.

3.6.4 Array – Hybridisierung und Waschschr

Die Hybridisierung für das beschriebene Experiment wurde automatisch mittels eines Hybridisierungsautomaten (HS 400, Tecan) durchgeführt, welcher aus 4 Hybridisierungskammern besteht. Vor dem Hybridisierungsprozess werden die Hybridisierungskammern mit ddH₂O gereinigt und trocken geblasen. Nach dem Einlegen der Mikroarrays in die sauberen Kammern wird das Gerät verschlossen und

eingeschaltet. Der Computer, mit dem der Tecan HS 400 in Verbindung steht, und das Programm „HS-Control“ wurden gestartet. Anschließend wurde am Tecan HS 400 das Hybridisierungsprogramm voreingestellt. Nach kurzer Zentrifugation der denaturierten Probe wurde sie sofort durch eine kleine Öffnung in die Kammer pipettiert und somit auf den Mikroarray aufgetragen. Die Kammer wurde geschlossen und das zuvor eingestellte Hybridisierungsprogramm gestartet. Die Hybridisierung dauerte 10 Stunden und lief bei 42°C ab. Danach fanden die Waschrunde mit den drei Waschlösungen statt. Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung und der Waschlösungen sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Hybridisierungslösung und der Waschlösungen

	20 x SSC	10% SDS	Formamid	H₂O	Gesamt- volumen
Hybridisierungslösung	87 ml	15 ml	120 ml	278 ml	500 ml
Waschlösung 1 2xSSC/0,03%SDS	100 ml	3 ml	-	897 ml	1000 ml
Waschlösung 2 1xSSC	50 ml	-	-	950 ml	1000 ml
Waschlösung 3 0,2xSSC	10 ml	-	-	990 ml	1000 ml

Ablauf des Hybridisierungsprogramms:

Tabelle 9: Das Programm der standardisierten und kontrollierten Hybridisierung am Tecan Gerät.

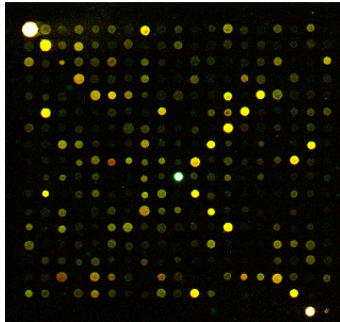
Programm	Lösungen	Temperatur	Anzahl und Dauer der Durchgänge
1. Waschschrift	Hybridisierungslösung	42,0° C	2 Durchgänge; Zeit 1 min; Verbleib der Hybridisierungslösung auf dem Slide 30: sec
2. Probeninjektion		42,0° C	
3. Hybridisierung		42,0° C	Agitationsfrequenz: Medium; Zeit 10 h
4. Waschschrift 1	Waschlösung 1	25,0° C	2 Durchgänge; Zeit 1 min; Hybridisierungslösung auf dem Slide 30: sec
5. Waschschrift 2	Waschlösung 2	25,0° C	2 Durchgänge; Zeit 1 min; Hybridisierungslösung auf dem Slide: 30 sec
6. Waschschrift 3	Waschlösung 3	25,0° C	1 Durchgang; Zeit 1 min; Hybridisierungslösung auf dem Slide 30: sec
7. Slide Trocknung		30,0° C	Zeit: 2 min 30 Sec; Abschließende Trocknung mit 2,5 bar Stickstoffzufuhr

Zur Auswertung der fertigen Arrays wurden diese eingescannt.

3.6.5 Scannen des Mitteldichtearrays und Auswertung

Der hybridisierte und getrocknete Array wurde mit einem GenePix Array-Reader 4000B der Firma Axon Instruments gescannt. Nach einem Pre-Scan des Arrays bei einer geringen Auflösung und einer schwachen Laserstärke wurde der Scannbereich markiert, innerhalb dessen der eigentliche Scannprozess dann ablief.

Die Scanparameter wurden auf folgende Werte eingestellt:



- Laserpower: beide Kanäle 100%
- Photomultiplikator [V]: 700 V / 532 nm
800 V / 635 nm
- Auflösung des Scanners: 10 μm (Pixelabstand)

Abbildung 22: Scanbild des GenePix (4000B)

Mit einem He-Neon-Laser wurden bei einer Wellenlänge von 532 nm (grün) und 635 nm (rot) die eingebauten Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt. Sie emittierten Wellenlängen, die mittels eines Photomultiplikators detektiert wurden. Beide Emissionswellenlängen wurden über zwei getrennte Kanäle auf den Detektor geleitet, um die Intensität der einzelnen Bildpixel zu messen. Das emittierte Licht ist proportional zur Menge der gebundenen markierten cDNA auf der Array-Oberfläche. Die Identifizierung der einzelnen Spots erfolgte automatisch („gefunden“/„nicht gefunden“). Die Spots, deren Durchmesser weniger als 50% bzw. mehr als 200% der Norm und/oder deren Intensität sich nicht von der Intensität des Hintergrunds abhoben, wurden als nicht gefunden („not found“) bezeichnet. Neben der automatischen Bewertung wurden die detektierten Spots in weitere Gruppen aufgeteilt. Schlechte Spots wurden von der Software automatisch markiert und aus der Auswertung ausgeschlossen.

Eine schiefe Verteilung der Werte ist charakteristisch, wobei die meisten Gene eine niedrige Expression aufweisen und nur eine kleine Menge der Gene Werte im oberen Bereich erreicht. Für die Genexpression kann aber genauso eine exponentielle Verteilung der Werte charakteristisch sein. Daher erwies sich eine logarithmische Transformation als sinnvoll.

Für die eingesetzten Mikroarrays mit einer großen Vielzahl von nichtspezifischen für das konkrete Experiment ausgewählten Sonden, erfolgte eine nicht-lineare, globale

Normalisierung. Da die Sonden über die gesamte Trägeroberfläche verteilt gespottet wurden, ist der Normalisierungslogarithmus blockweise angewendet worden.

3.7 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse der Blutbildanalyse und die Leistungsparameter wurden mit dem Statistik Programm SPSS 11.0 zunächst deskriptiv, mit der Berechnung von Mittelwert, Median, Standardabweichung, 25. und 75. Perzentil, sowie Minimum und Maximum, später dann explorativ durchgeführt. Dazu wurden die Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurde die Varianzhomogenität mittels Levene –Test geprüft und die entsprechenden Signifikanztest (Allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung und anschließend als post-hoc Test der T-Test) angewendet. Geprüft wurde bei den Immunzellen auf signifikante Unterschiede der Parameterkonzentrationen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Die Leistungsdaten wurden über den T-Test für unabhängige Stichproben auf ihre Abhängigkeit vom Trainingszustand geprüft. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wird die H_0 -Hypothese (Gleichheit der 2 Gruppen) abgelehnt (Bortz, Döring & Bortz, 2003).

Die Auswertung der Genexpressionsdaten wurde folgendermaßen durchgeführt: in die Analyse gingen 5386 Gene ein. Gene mit weniger als fünf biologischen Replikaten mit ausreichender Spot-Qualität/Intensität oder Gene mit einer niedrigen Varianz im Änderungsverhältnis gegenüber den Proben wurden ausgeschlossen. Damit blieben 786 Gene übrig, bei denen ein Vektor der p-Value, im Gen-für-Gen-Vergleich, bestimmt wurde. Zusätzlich wurde zu jedem p-Value ein q-Value bestimmt, zur Kontrolle der false discovery rate (FDR), die durch den multiplen Vergleich entstehen.

Beim Vergleich prä vs. post wurde die Signifikanz mit $p \leq 0,005$ mit einer FDR von 2%, d.h. ca. 10 falschpositive bei 500 ausgewählten Genen angesetzt. Beim Vergleich Trainiert vs. Untrainiert und 234 ausgewählten Genen wurde die Schwelle bei $p \leq 0,005$ mit einer FDR von 5% (auch ca. 10 falsch positive) festgelegt. Mittels formaler Clusteranalyse wurden typische Muster der Genexpression in Folge der physischen Belastung bestimmt und von co-exprimierten Genen identifiziert. Bei gleicher Qualität der zwei Spots für ein Gen auf einem Microarray wurde der Mittelwert aus den zwei Werten errechnet. Die Expressionen der Gene zum Zeitpunkt A und C wurden verglichen. Das Verhältnis aus Beiden wurde mittels eine k – means

– Algorithmus bestimmt. Die Analyse des Algorithmus wurde mit verschiedenen Clustern durchgeführt, wobei jeder Durchgang mit 100 unterschiedlichen Startwerten gerechnet wurde. Letztendlich konnten 3 Cluster selektiert werden. Danach wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der logarithmierten Verhältnisse für jedes Gen errechnet.

Die Genexpressionsdaten der asthmarelevanten Gene wurden zusätzlich auf Normalverteilung und Varianzhomogenität mit oben genannten Tests überprüft und einer Analyse mittels des Allgemeinen Linearen Modells mit Messwiederholung zugeführt. Die Analyseergebnisse entsprachen den Ergebnissen aus der Clusteranalyse. Zur Prüfung der Signifikanz zwischen trainiert und untrainiert bei den einzelnen Messzeitpunkten wurde der t-Test eingesetzt.

4 Ergebnisse

Zunächst erfolgt die Darstellung der leistungsphysiologischen Daten aus dem Dauertest. Dann erfolgt die Darstellung der Messergebnisse aus der Blutbildanalyse und der Genexpression, jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung.

4.1 Ergebnisse aus dem Anamnesefragebogen

Mittels eines kurzen Fragebogens wurden asthmarelevante Symptome abgefragt.

Der Fragebogen bestand aus 12 Hauptfragen, die in den meisten Fällen nur mit ja oder nein zu beantworten waren und nur bei den Fragen 8, 9 und 11 sollten konkrete Angaben gemacht werden. Von den 41 in der Studie untersuchten Probanden, haben allerdings nur 36 Probanden (19 Trainierte und 17 Untrainierte) den Fragebogen ausgefüllt, so dass sich die nachfolgenden Angaben immer auf diese 36 Probanden beziehen.

Von den untersuchten Probanden gaben 16 an unter Heuschnupfen zu leiden und zwei kreuzten an schon mal Asthma gehabt zu haben. Lediglich ein Proband gab an, dass er im Winter unter sehr kalten und trockenen Umweltbedingungen, schon mal Symptome hatte, die dem EIA entsprachen. Allerdings wurde das EIA bei dieser Person klinisch (z.B. über einen FEV₁-Test) nicht bestätigt. Betrachtet man die Angaben der Probanden zu belastungsbedingten Symptomen, so ist zu bemerken, dass nur vier Probanden mindestens zwei der sieben möglichen Symptome unter Belastung schon mal bei sich festgestellt haben. Die meisten Probanden (19%) gaben an, infolge einer Belastung mit Husten reagiert zu haben. Nur ein Proband hat angegeben, die Belastung aufgrund eines der genannten Symptome (Magenschmerzen) abgebrochen zu haben.

Betrachtet man die Expressionswerte der Probanden, die mindestens zwei der belastungsasthma-induzierten Symptome angekreuzt haben, so lässt sich sagen, dass bei Ihnen die Genexpression, von insbesondere ALOX5 und ALOX5AP, in die gleiche Richtung und auch im gleichen Maße regulieren, wie im Mittel.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Fragebogen diffiziler nach Ereignissen hätte fragen müssen, unter denen diese belastungsinduzierten Asthmasymptome aufgetreten sind. Im Gespräch mit einzelnen Sportlern wurde deutlich, dass solche

Symptome in erster Linie, wie auch aus den Hypothesen von Anderson et al. (Anderson & Daviskas, 2000) ersichtlich, insbesondere unter kalten Umweltbedingungen in Kombination mit trockener Luft (z.B. Joggen oder Skilanglauf im Winter) entstanden sind. Die Belastungsintensität scheint dabei außerdem eine nicht ganz unerhebliche Rolle zu spielen, denn es wurde angegeben, dass es vor allem nach intensiven Belastungen zu derartigen Symptomen gekommen war.

4.2 Ergebnisse des Dauertest

Der Dauertest wurde von allen Probanden mit 80% der IAS über 90 Minuten durchgeführt.

Es zeigten sich bei Herzfrequenz und Laktat keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen, obwohl die Belastung von den Trainierten bei einer deutlich höheren Wattzahl geleistet wurde. Auch aus subjektiver Sicht (BORG-Wert) fühlten sich beide Gruppen gleich stark belastet. Lediglich der systolische Blutdruck unterschied sich in beiden Gruppen, sowohl in Ruhe, als auch am Ende der Belastung signifikant. Allerdings lagen alle Werte in einem physiologisch zu erwartenden Bereich.

Tabelle 10: Ergebnisse aus dem Dauertest (HF= Herzfrequenz, RR=Blutdruck, * = $p \leq 0,05$)

	Trainiert		Untrainiert	
	MW	SD	MW	SD
IAS 80%	221*	45	135*	42
BORG-Wert	14	2	14	2
HF _{Ruhe}	69	12	73	11
HF _{90'}	159	17	153	15
RRsys _{Ruhe}	126	13	117	8
RRdia _{Ruhe}	77	8	80	7
RRsys _{90'}	161*	21	143*	14
RRdia _{90'}	63	10	71	12
Laktat _{Ruhe}	1,3	0,3	1,2	0,2
Laktat _{90'}	2,2	0,9	2,4	0,9

4.3 Hämatokrit und Blutzellen

Die Blutzellen und der Hämatokrit wurden in Bezug auf den Ruhewert (A) und in Bezug auf den 45' – Nachbelastungswert (C) auf ihre Signifikanz mittels des T-Tests für unabhängige Stichproben geprüft.

Bei den Trainierten änderte sich der Hämatokrit in Abhängigkeit vom Ruhewert zu allen Messzeitpunkten signifikant. Bei den Untrainierten konnte allerdings keine signifikante Veränderung der Erholungswerte in Bezug auf den Ruhewert nachgewiesen werden.

Das Hämoglobin zeigte bei beiden Gruppen eine signifikante Veränderung direkt durch die Belastung (A-B). Bei den Untrainierten kam es außerdem zu einer signifikanten Abnahme von 45' nach der Belastung zu 2 Stunden nach der Belastung.

Die Erythrozyten zeigten ebenfalls eine hochsignifikante Abhängigkeit von der Belastung. Die Zahl der Erythrozyten änderte sich ausgehend vom Ruhewert (A) signifikant gegenüber dem Wert direkt nach Belastung (B), unabhängig vom Trainingszustand. Bei den Trainierten änderte sich die Zahl der Erythrozyten zu jedem Messzeitpunkt signifikant. Insgesamt konnte keine Abhängigkeit der Erythrozyten vom Trainingszustand nachgewiesen werden, allerdings unterschieden sich beide Gruppen in den Ruhewerten signifikant voneinander.

Die Leukozyten und Leukozyten-Subpopulationen zeigten alle eine hochsignifikante Abhängigkeit von der Belastung. Bei den Leukozyten kam es infolge der Belastung zu einer signifikanten Erhöhung, der sog. belastungsbedingten Leukozytose. Zu den folgenden Messzeitpunkten (C und D) änderten sich die Leukozyten in Bezug auf den Ruhewert in beiden Gruppen ebenfalls signifikant.

Die Lymphozyten nahmen durch die Belastung in beiden Gruppen signifikant zu. Die Veränderung von Messzeitpunkt A zu C ist allerdings nur bei den Trainierten signifikant. Bis zum Messzeitpunkt D stieg die Zahl der Lymphozyten bei beiden Gruppen weiter signifikant an. Die Veränderung von Messzeitpunkt B zu C und C zu D ist ebenfalls in beiden Gruppen signifikant.

Die Monozytenzahl nahm durch die Belastung bei den Trainierten signifikant zu. Bis 2 Stunden nach der Belastung waren jedoch keine gruppenspezifischen Veränderungen in Bezug auf die Ruhewerten zu verzeichnen. Lediglich die Veränderung von Messzeitpunkt C zu D ist bei beiden Gruppen signifikant.

Ergebnisse

Die Zahl der Granulozyten stieg durch die Belastung bis zum Ende (2 Stunden nach der Belastung) bei beiden Gruppen stetig signifikant an.

Tabelle 11: Darstellung der Immunparameter vor, direkt nach, 45min und 2 Stunden nach der Belastung (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MZP=Messzeitpunkt)

* = $p \leq 0.05$ (Veränderung in Abhängigkeit vom Ruhewert, MZP A versus MZP B, C oder D),

= $p \leq 0.05$ (Veränderung in Abhängigkeit vom MZP C (45'post), MZP C versus MZP B oder D)

‡ = $p \leq 0.05$ (signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Trainingszustand)

Immunparameter		Vor (MZP A)		Nach (MZP B)		45' p (MZP C)		2 h p (MZP D)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Erythrozyten	Trainiert	5,0[‡]	0,33	5,4*	0,36	5,1*[#]	±0,34	5,2*[#]	0,39
	Untrainiert	5,3[‡]	0,29	5,6*	0,33	5,4[#]	±0,67	5,3[#]	0,31
Leukozyten	Trainiert	4,7[‡]	0,94	8,3*	2,31	8,8*	±2,76	10,0*[#]	2,50
	Untrainiert	5,3[‡]	0,99	8,7*	1,75	10,2*[#]	±2,97	11,6*[#]	2,37
Lymphozyten	Trainiert	1,6[‡]	0,34	2,6*	0,83	1,7*[#]	±0,36	1,8*[#]‡	0,44
	Untrainiert	1,8[‡]	0,23	2,8*	0,48	2,0	±0,32	2,2*[‡]	0,41
Monozyten	Trainiert	0,34	0,12	0,42*	0,20	0,38[#]	±0,14	0,36[#]	0,17
	Untrainiert	0,39	0,17	0,46	0,21	0,41	±0,18	0,41[#]	0,22
Granulozyten	Trainiert	2,7	0,68	5,3*	1,63	6,8*[#]	±2,55	7,9*[#]	2,39
	Untrainiert	3,1	0,89	5,5*	1,62	7,8*[#]	±2,80	8,6*[#]	2,30
Thrombozyten	Trainiert	232	48,6	320*	66,1	241*[#]	±51,0	238*[#]	50,3
	Untrainiert	230	46,2	295*	46,5	239*[#]	±45,8	243*[#]	43,7
Hämoglobin	Trainiert	9,4	0,56	10,0*	0,64	9,5	±0,57	9,5	0,67
	Untrainiert	9,5	0,59	9,8*	0,66	9,2*	±0,65	9,4[#]	0,58
Hämatokrit	Trainiert	0,47	0,02	0,50*	0,03	0,48*[#]	±0,03	0,48*[#]	0,03
	Untrainiert	0,47	0,03	0,50*	0,03	0,47[#]	±0,03	0,47[#]	0,02

4.4 Humorale Kontrollparameter

Zur Kontrolle der Akuten Phase Reaktion wurden zwei entscheidende Zytokine im Plasma gemessen:

4.4.1 Interleukin 6

Die Konzentration von Interleukin 6 änderte sich sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten in Abhängigkeit von der Belastung. Bei den Trainierten wurde in Ruhe eine Konzentration von 0,79 pg/ml ($\pm 1,48$ pg/ml) im Plasma gemessen. Die Untrainierten unterschieden sich in ihrer Konzentration nicht signifikant von den

Trainierten und wiesen in Ruhe eine Konzentration von 0,81 pg/ml ($\pm 1,36$ pg/ml) auf. Infolge der 90minütigen Belastung kam es sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten zu einer signifikanten Zunahme der IL-6 Konzentration. Bei den Trainierten stieg sie auf 5,28 pg/ml ($\pm 2,67$ pg/ml) und bei den Untrainierten auf 5,67 pg/ml ($\pm 3,19$ pg/ml). Zum Messzeitpunkt C (45 Minuten nach der Belastung) stieg die Konzentration in beiden Gruppen weiter leicht, jedoch nicht signifikant an (Trainierte: 5,37 pg/ml ($\pm 3,53$ pg/ml); Untrainierte: 6,10 pg/ml ($\pm 2,87$ pg/ml)). Bis zum Ende (2 Stunden nach der Belastung) stieg die Konzentration in beiden Gruppen weiter an. Bei den Trainierten stieg sie auf 6,14 pg/ml ($\pm 5,35$ pg/ml). Bei den Untrainierten kam es sogar noch mal zu einem signifikanten Anstieg auf 8,05 pg/ml ($\pm 5,80$ pg/ml).

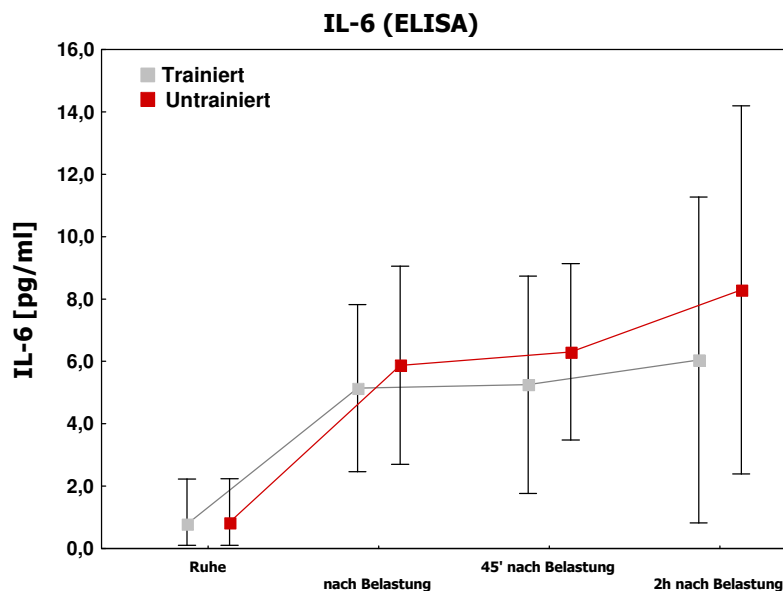


Abbildung 23: Veränderung der Interleukin 6 Konzentration zu den Messzeitpunkten A, B, C und D (dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung)

4.4.2 C-reaktives Protein

Die Konzentration von CRP änderte sich in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt bei beiden Gruppen. In Ruhe betrug die Konzentration bei den Trainierten 0,43 mg/l ($\pm 0,46$) und bei den Untrainierten 0,61 mg/l ($\pm 0,50$ mg/l). Infolge der Ausdauerbelastung kam es zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg ($p \leq 0,05$) der Konzentration in beiden Gruppen (Trainierte: 0,49 mg/l ($\pm 0,51$ mg/l); Untrainierte: 0,71 mg/l ($\pm 0,54$ mg/l)). Im weiteren Verlauf, bis 2 Stunden nach der Belastung fiel die Konzentration des CRP signifikant ($p \leq 0,05$) bei den Trainierten auf 0,40 mg/l ($\pm 0,41$ mg/l) und bei den Untrainierten auf 0,58 mg/l ($\pm 0,50$ mg/l).

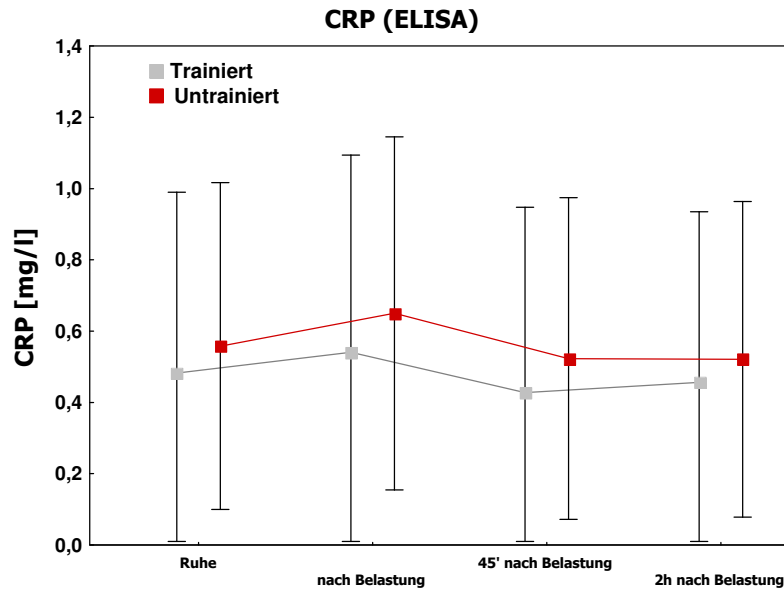



Abbildung 24: Veränderung der CRP – Konzentration zu den Messzeitpunkten A, B, C und D (dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung)

4.5 Ergebnisse der Genexpression

In den Abbildungen 25 und 26 sind die bildlichen Darstellungen der Clusteranalysen zu erkennen. In der Abbildung 25 (Prä vs. Post Vergleich) ist zu erkennen, dass sich sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten deutlich zwei Gruppen von Genen unterscheiden lassen. In die Auswertung wurden 552 Gene einbezogen. Gene die bei den Untrainierten infolge der Belastung hochregulierten und solche die herunterregulierten, finden sich in gleicher Weise bei den Trainierten (auszugsweise Darstellung in Tabelle 12).

In der Abbildung 26, die die Abhängigkeit bestimmter Gene vom Trainingszustand darstellt, lassen sich 234 signifikant regulierte Gene erkennen. Klar zu erkennen ist, dass diese Gene sowohl in Ruhe, als auch unter Belastung bei Trainierten anderes regulieren, als bei Untrainierten (auszugsweise Darstellung in Tabelle 13).

Es gab lediglich 17 Gene, die eine Abhängigkeit sowohl vom Trainingszustand, als auch von der Belastung zeigten (detaillierte Auflistung siehe Tabelle: 14).

S.D. from mean

 <-2 -1 0 1 >2

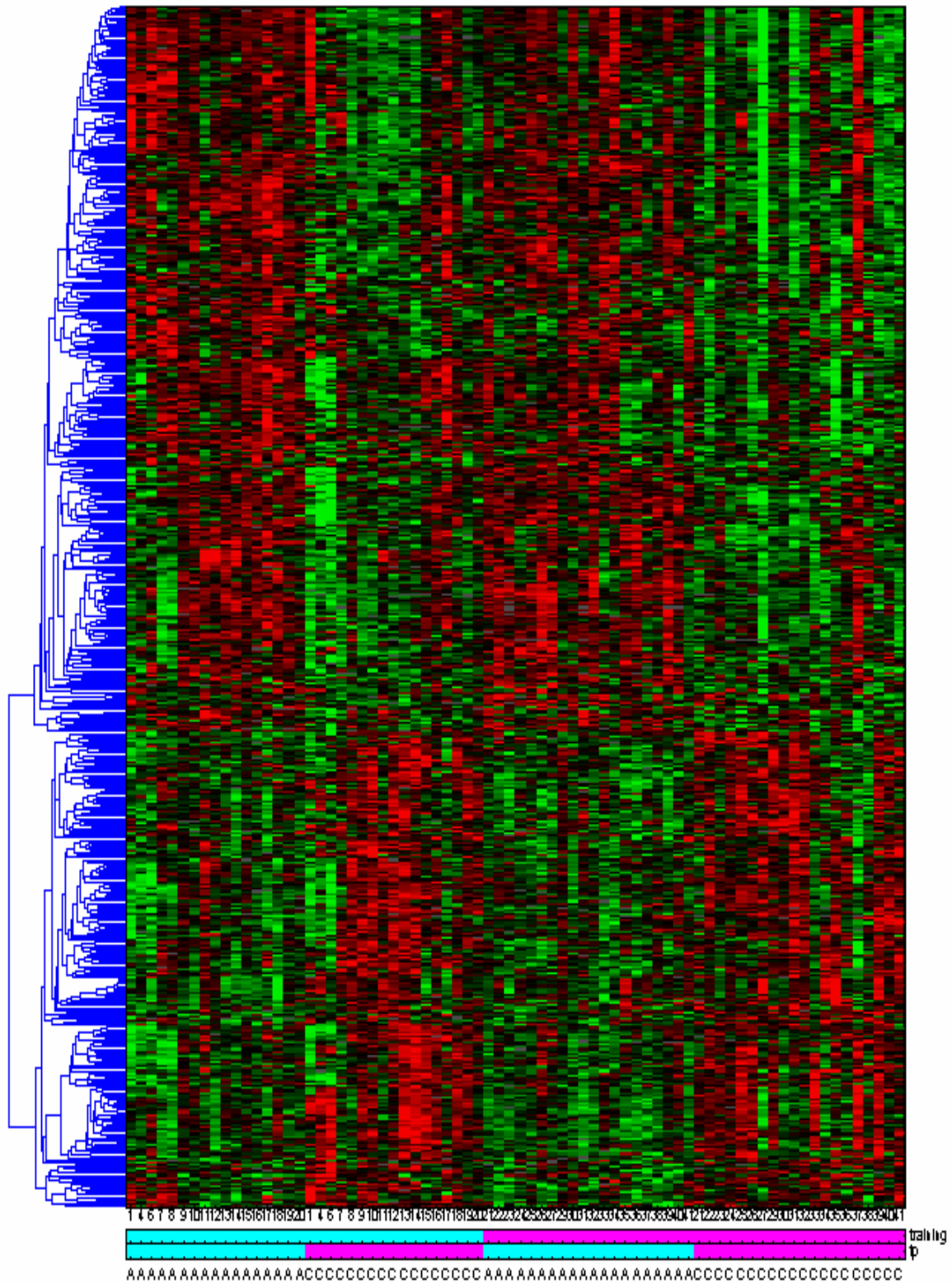


Abbildung 25: Bildliche Darstellung der Clusteranalyse von Genen, die in Abhängigkeit von der Belastung signifikant reguliert wurden (552 Gene)

rot = Aufregulation
 grün = Abregulation

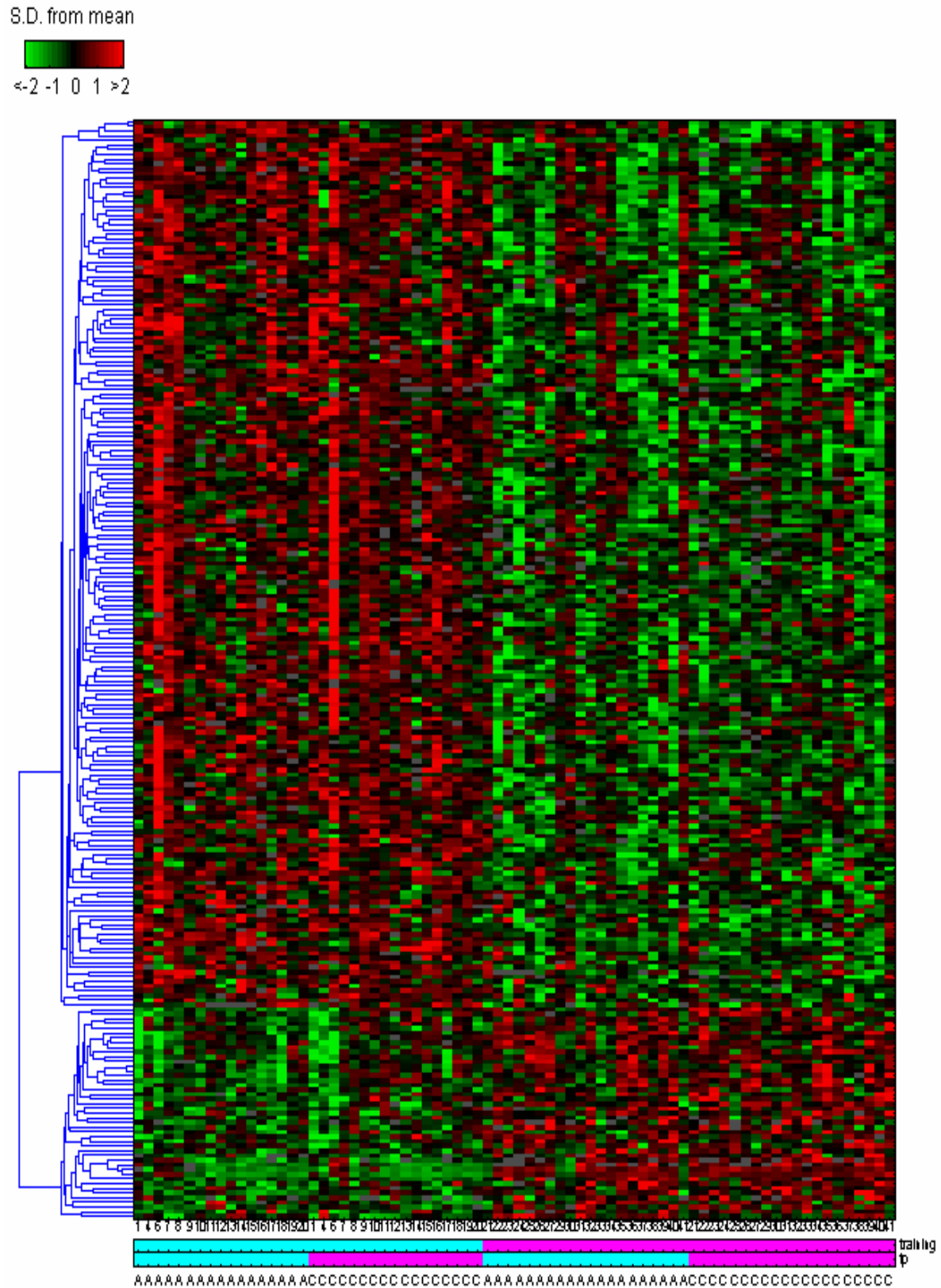


Abbildung 26: Bildliche Darstellung der Clusteranalyse von Genen, die in Abhängigkeit vom Trainingszustand signifikant reguliert wurden (234 Gene)

rot = Aufregulation
grün = Abregulation

Um die Gene entsprechend beschreiben zu können, sind folgende Informationen über die eingesetzten Oligonukleotidsequenzen unabdingbar: Genname (HUGO-Name) und die entsprechende Referenzsequenz der mRNA (Accession Number). Diese Informationen können aus öffentlich zugänglichen Datenbanken, die Genom – Annotationen verwalten, entnommen werden. Durch den täglich fortschreitenden Wissensstand der Forschung werden diese Datenbanken regelmäßig aktualisiert. Allerdings enthalten diese Datenbanken vereinzelt nicht alle Informationen zu einem Gen, weshalb es sinnvoll ist mehrere Datenbanken zu nutzen um die relevanten Gene gut zu analysieren. Die hier vorliegende Beschreibung der Gene bezieht sich auf den Informationsstand der Datenbanken von Mai 2006. Folgende Datenbanken wurden von uns zur Beschreibung der ermittelten Gene auf dem Chip eingesetzt:

- ✓ NCBI (National Center for Biotechnology Information)
- ✓ Genecards (Weizmann Institut for Science)

Ergebnisse

Tabelle 12: exemplarischer Auszug aus der Genliste der Gene, die sich infolge der Belastung signifikant verändert haben (jeweils 10 Gene mit größter Auf- bzw. Abregulation) bezogen auf die größte Differenz des Gesamtmittelwertes des Gens (post-pre) = grau hinterlegt (ntr=Nichttrainierte, tr=Trainierte, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung)

Accession Number	Hugo	Best UniGene hit gene	MW				SD			
			ntr pre	ntr post	tr pre	tr post	ntr pre	ntr post	tr pre	tr post
NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	0,25	1,55	-0,09	0,99	0,58	0,89	0,44	0,80
NM_001629	ALOX5AP	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	0,29	0,99	0,21	0,85	0,35	0,47	0,24	0,36
NM_024753	TTC21B	Transcribed locus	-0,07	0,55	-0,16	0,40	0,35	0,42	0,30	0,44
NM_004513	IL16	Interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	0,90	1,36	1,11	1,63	0,52	0,83	0,38	0,55
NM_005345	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	0,19	0,67	0,22	0,73	0,29	0,47	0,34	0,45
AA398757	IMAGE:727137	Transcribed locus	0,29	0,65	0,53	1,03	0,29	0,58	0,50	0,71
NM_000574	DAF	Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	0,41	0,92	0,40	0,88	0,26	0,42	0,22	0,44
NM_002173	IFNA16	Interferon, alpha 16	0,55	1,08	0,65	1,12	0,41	0,70	0,38	0,59
NM_001946	DUSP6.1	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-0,74	-0,19	-0,89	-0,43	0,33	0,41	0,24	0,41
NM_004778	GPR44	G protein-coupled receptor 44	0,25	-0,17	0,67	0,01	0,49	0,26	0,74	0,43
NM_003243	TGFB3	Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)	1,45	0,90	1,79	1,07	0,52	0,33	0,58	0,42
NM_006725	CD6	CD6 antigen	1,79	1,32	2,06	1,34	0,72	0,50	0,76	0,59
NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	0,85	0,16	0,74	-0,01	0,40	0,46	0,31	0,48
NM_004131	GZMB	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	1,42	0,81	1,67	0,91	0,60	0,41	0,56	0,45
NM_002122	sm 8	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	2,93	2,38	3,90	3,14	0,95	1,01	1,09	0,87
NM_004131	GZMB	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	2,05	1,57	2,58	1,72	0,80	0,47	0,76	0,57
NM_005041	PRF1	Perforin 1 (pore forming protein)	1,85	1,16	2,24	1,33	0,71	0,37	0,66	0,34
NM_001337	CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	1,69	1,17	1,93	1,01	0,59	0,41	0,51	0,38
NM_000878	IL2RB	Interleukin 2 receptor, beta	1,44	0,99	1,98	1,04	0,65	0,49	0,56	0,46

Ergebnisse

Tabelle 13: exemplarischer Auszug aus der Genliste der Gene, die sich in Abhängigkeit vom Trainingszustand signifikant verändert haben (10 Gene die in Ruhe bei Trainierten höher regulierten als bei Untrainierten und 10 Gene, die in Ruhe bei Untrainierten höher regulierten als bei Trainierten). (ntr=Nichttrainierte, tr=Trainierte, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung)

Accession Number	hugo	Best UniGene hit gene	MW				SD			
			ntr pre	ntr post	tr pre	tr post	ntr pre	ntr post	tr pre	tr post
BM714384	CYB5	Cytochrome b-5	-1,44	-1,65	-0,20	0,16	0,92	0,84	0,73	0,30
AB007861	MGC22014	Hypothetical protein MGC22014	-0,75	-0,71	0,48	0,69	0,51	0,65	0,73	0,29
NM_002122	sm 8	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	2,93	2,38	3,90	3,14	0,95	1,01	1,09	0,87
NM_003954	MAP3K14	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	-0,07	-0,07	0,62	0,56	0,23	0,27	0,52	0,55
AF189270	UC28	Transcribed locus, weakly similar to XP_209041.2 PREDICTED: similar to KIAA1503 protein [Homo sapiens]	-0,32	-0,32	0,37	0,77	0,44	0,59	0,68	0,45
NM_006206	PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0,32	0,72	0,94	1,00	0,56	0,44	0,41	0,58
AK098205	AK3L1	Adenylate kinase 3	0,61	0,78	1,16	1,16	0,56	0,52	0,52	0,43
NM_012340	NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	0,40	0,47	0,87	0,84	0,45	0,48	0,41	0,46
NM_030954	RNF170		0,48	0,47	0,93	0,90	0,30	0,27	0,41	0,47
NM_003839	TNFRSF11A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator	-0,28	-0,24	0,13	0,48	0,41	0,42	0,30	0,31
BX648935	TBL1XR1	Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	-0,31	-0,36	-0,72	-0,58	0,24	0,24	0,34	0,29
AK094987	MCCC2	Methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)	-0,47	-0,42	-0,87	-0,79	0,41	0,45	0,50	0,31
AF149774	CARD4		-0,12	-0,12	-0,54	-0,52	0,29	0,35	0,36	0,39
R43908	IMAGE:33727		0,16	0,00	-0,27	-0,28	0,46	0,34	0,41	0,26
AL833474	TBC1D7	TBC1 domain family, member 7	-1,58	-1,75	-2,01	-2,27	0,41	0,52	0,47	0,55
M73047	TPP2	Tripeptidyl peptidase II	-0,81	-0,58	-1,25	-1,32	0,46	0,35	0,54	0,44
NM_013277	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	-1,76	-1,97	-2,21	-2,22	0,54	0,39	0,40	0,28
N34897	IMAGE:276716	Transcribed locus	-0,45	-0,66	-0,92	-1,05	0,15	0,25	0,23	0,23
R94727	IMAGE:198582		-0,16	-0,17	-0,65	-0,69	0,23	0,31	0,45	0,47
NM_174950	FLJ30435	Transcribed locus	-1,69	-1,79	-2,21	-2,33	0,38	0,63	0,52	0,60

Ergebnisse

Tabelle 14: Gene aus der Genliste, die sich sowohl in Abhängigkeit vom Trainingszustand, als auch von der Belastung verändert haben (in alphabetischer Reihenfolge).
(ntr=Nichttrainierte, tr=Trainierte, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung)

Accession Number	Hugo	Best UniGene hit gene	MW				SD			
			ntr pre	ntr post	tr pre	tr post	ntr pre	ntr post	tr pre	tr post
NM_021723	ADAM22	ADAM metallopeptidase domain 22	0,33	0,59	0,62	0,83	0,25	0,30	0,33	0,36
NM_000674	ADORA1	Adenosine A1 receptor	-0,86	-0,96	-1,18	-1,36	0,20	0,37	0,29	0,30
BF527946	FLJ14834	LOC440132	0,08	0,02	0,21	0,27	0,16	0,26	0,17	0,19
AA995114	IMAGE:1625822	Transcribed locus, moderately similar to XP_508590.1 PREDICTED: hypothetical protein XP_508590 [Pan troglodytes]	0,74	0,89	1,01	1,20	0,24	0,29	0,29	0,31
N34897	IMAGE:276716	Transcribed locus	-0,45	-0,66	-0,92	-1,05	0,15	0,25	0,23	0,23
NM_017526	LEPROT	Leptin receptor	0,24	0,08	0,09	-0,06	0,17	0,17	0,15	0,27
AK093177	LSM6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	-0,22	-0,40	-0,48	-0,63	0,31	0,21	0,29	0,19
NM_153029	N4BP1	Transcribed locus	0,11	0,40	0,33	0,55	0,18	0,26	0,22	0,33
NM_002768	PCOLN3	Procollagen (type III) N-endopeptidase	-0,55	-0,74	-0,77	-0,86	0,26	0,18	0,20	0,18
NM_004862	PIG7	Lipopolysaccharide-induced TNF factor	2,13	2,41	1,94	2,12	0,30	0,29	0,23	0,26
NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	0,01	-0,13	-0,20	-0,49	0,21	0,24	0,26	0,28
NM_000540	RYR1	Ryanodine receptor 1 (skeletal)	-0,38	-0,53	-0,62	-0,80	0,20	0,18	0,30	0,29
NM_002125	sm 2	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	3,36	3,03	3,10	2,55	0,54	0,41	0,35	0,48
NM_021983	sm 3	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 6 (pseudogene)	3,19	2,85	2,96	2,44	0,39	0,31	0,29	0,47
NM_002122	sm 8	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	2,93	2,38	3,90	3,14	0,95	1,01	1,09	0,87
NM_030799	SMAP-5	Yip1 domain family, member 5	-0,08	0,08	-0,29	-0,05	0,22	0,21	0,23	0,19
NM_014452	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	-0,55	-0,75	-0,82	-0,95	0,30	0,31	0,22	0,24

4.6 Gene der Akuten-Phase-Reaktion

Die Werte der gemessenen Gene entsprechen dem Ratio des Gens zur Kontrollzelllinie (Sig-M5).

4.6.1 IL-6 (Interleukin 6)

Interleukin 6 ist ein Zytokin mit einer großen Bandbreite an biologischen Funktionen: so spielt es beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen in Ig-sezernierende Zellen, es induziert die Differenzierung von Nervenzellen in Hepatozyten und es induziert die Akut-Phase Reaktion.

Das Gen für IL-6 befindet sich auf dem Chromosom 7 und ist dort bei 7p21 lokalisiert. Die cDNA besteht aus 4.796 Basen, diese bilden 212 Aminosäuren und insgesamt hat das Gen ein Molekulargewicht von 23,7 kDA (NCBI, 2006).

Die Genexpression von IL-6 zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Belastung. Sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten kommt es infolge der Ausdauerbelastung zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression von IL-6. Bei den Trainierten steigt sie von -1,09 ($\pm 0,29$) auf -0,93 ($\pm 0,32$) und bei den Untrainierten von -1,11 ($\pm 0,27$) auf -0,91 ($\pm 0,25$).

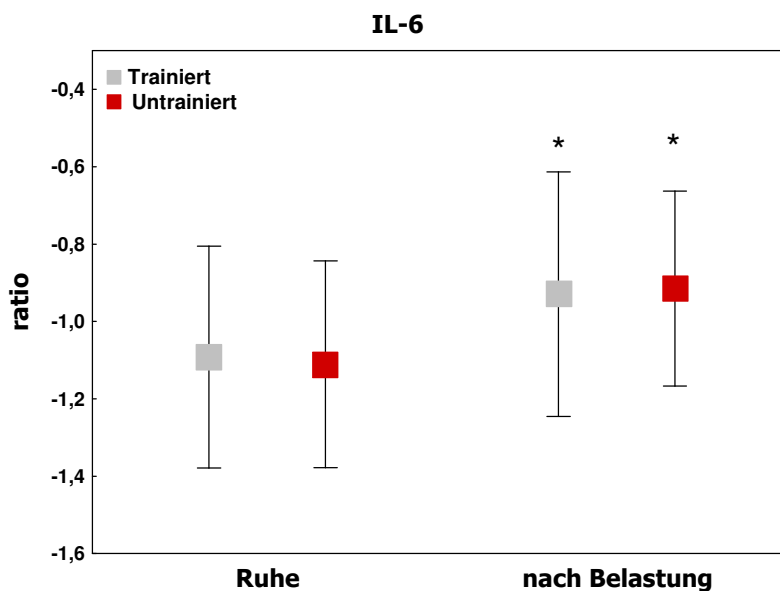


Abbildung 27: Veränderung der Genexpression von IL-6 (*= $p=0.05$)

4.6.2 IL-6 R (Interleukin 6 Rezeptor)

Interleukin 6 ist ein multifunktionales Zytokin, dass essentiell für die Regulation der Immunantwort und Akute Phase Reaktion ist. Seine vielfältigen Aktionen werden über einen heterodimeren Rezeptor, der aus zwei membrangebundenen Glykoproteinen: einer 80kDa IL-6-bindenden Untereinheit und gp 130 (IL-6ST) besteht aktiviert. Der IL-6Rezeptor bindet mit einer niedrigen Affinität an IL-6, transduziert jedoch kein Signal. Zur Signalaktivierung ist eine Assoziation zu IL-6ST notwendig. Eine Aktivierung des IL-6R führt zur Regulation der Immunantwort, Akuten-Phase-Reaktion und der Hämatopoiesis. Das Gen für den IL-6R ist auf dem Chromosom 1 bei 1q21 lokalisiert. Das Gen besteht aus 62.519 Basen, ist aus 468 Aminosäuren zusammengesetzt und hat ein Molekulargewicht von 51,5 kDa (NCBI, 2006).

Bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten kommt es infolge der Belastung zu einer signifikant gesteigerten Expression des IL-6Rezeptors. Bei den Trainierten steigt die Expression von 0,54 ($\pm 0,24$) auf 0,80 ($\pm 0,36$) und bei den Untrainierten von 0,61 ($\pm 0,29$) auf 0,93 ($\pm 0,27$).

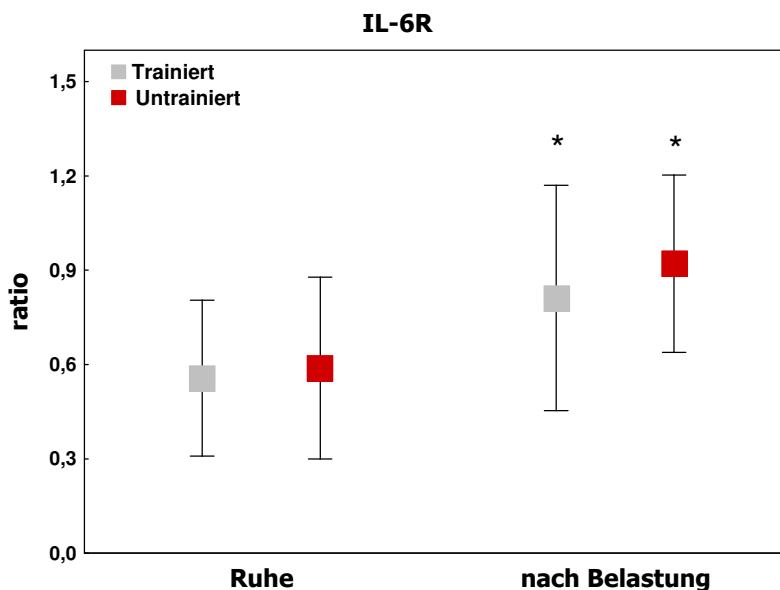


Abbildung 28: Veränderung der Genexpression von IL-6R (*= $p \leq 0,05$)

4.6.3 CRP

Interleukin 6 und TNF- α sind inflammatorische Zytokine und die hauptsächlich für die Sekretion von CRP in der Leber verantwortlich. Die Konzentration von CRP im Plasma steigt insbesondere während der Akuten-Phase Reaktion, infolge von Gewebeschäden, Infektionen oder anderen inflammatorischen Stimuli stark an.

Das CRP-Gen liegt auf dem Chromosom 1 und ist dort bei 1q21-q23 lokalisiert. Die cDNA besteht aus 1.912 Basen, die 224 Aminosäuren bilden (NCBI, 2006).

Die Genexpression des CRP zeigt infolge der Belastung keine signifikante Reaktion. Zwischen den beiden Gruppen bestehen ebenfalls keine Unterschiede. Bei den Trainierten kommt es durch die Belastung zu einer leichten Zunahme der Expression von $-0,03 (\pm 0,17)$ auf $0,00 (\pm 0,21)$ und bei den Untrainierten nimmt die Expression leicht ab. Sie fällt minimal von $-0,01 (\pm 0,26)$ auf $-0,02 (\pm 0,30)$.

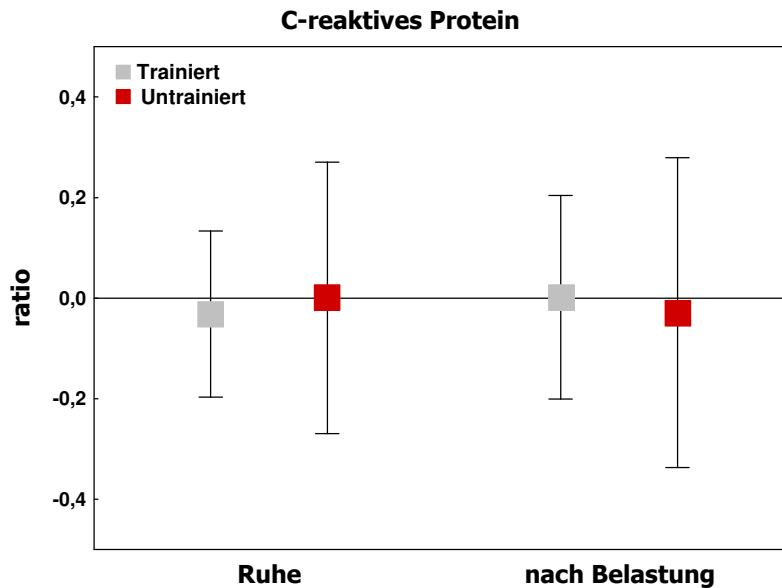


Abbildung 29: Veränderung der Genexpression von CRP

4.7 Asthmarelevante Gene

Die Werte der gemessenen Gene entsprechen auch hier der Ratio des Gens zur Kontrollzelllinie (Sig-M5).

4.7.1 ALOX5

ALOX5 ist das Schlüsselgen des Eikosanoidstoffwechsels. Das Gen encodiert ein Mitglied der Lipooxygenase-Gen-Familie, die Arachidon 5-Lipooxygenase (5-LO), und spielt eine doppelte Rolle bei der Synthese der Leukotriene aus Arachidonsäure. Es ist somit das Schlüsselenzym des Leukotrienstoffwechsels. Das encodierte Protein, welches vorrangig von Knochenmarkszellen exprimiert wird, katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure in 5HPETE und später in Leukotrien A₄.

ALOX5 ist auf dem 10. Chromosom lokalisiert (10q11.2) und hat eine Größe von 71.875 Basen. Es hat eine Länge von 673 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 77,9 kDa (NCBI, 2006).

Durch die Aktivität von p38MAPK wird es aus dem Zellkern exportiert. ALOX5 translokalisiert zur Membran, wo es mit der Arachidonsäure reagiert, die sich an ein 18kD Protein (FLAP) bindet.

Durch die Belastung war eine erhöhte Expression von ALOX5 sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten zu verzeichnen. Bei den Trainierten stieg ALOX5 nicht signifikant von 0,96 ($\pm 0,30$) auf 1,11 ($\pm 0,31$) an. Bei den Untrainierten kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der ALOX5 von 0,92 ($\pm 0,52$) auf 1,36 ($\pm 0,53$). Eine Abhängigkeit vom Trainingszustand bestand nicht.

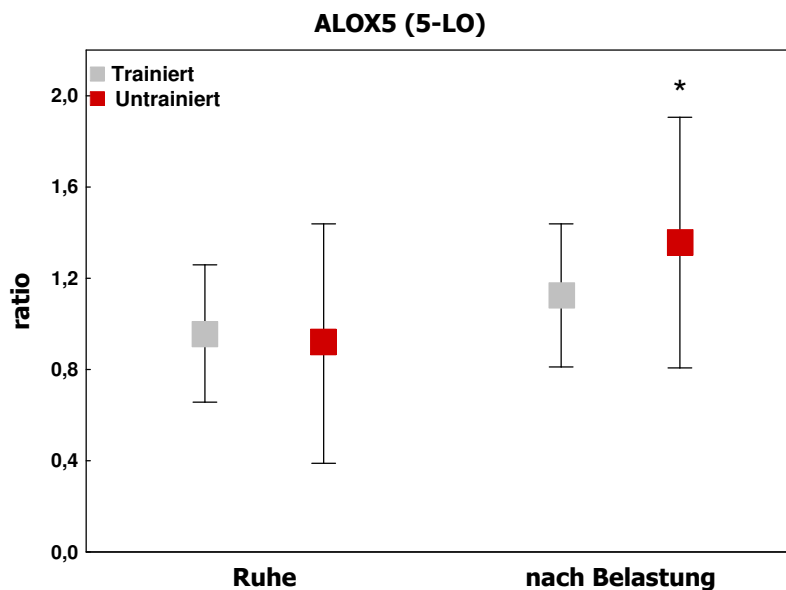


Abbildung 30: Veränderung der Genexpression von ALOX5 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.2 ALOX5AP

ALOX5AP ist das Gen, das das Arachidon-5-Lipooxygenase aktivierende Protein (FLAP) kodiert. Es hat eine DNA Größe von 28.890 Basen, eine mRNA Größe von 873 Basenpaaren und beinhaltet 5 Exons. ALOX5AP ist auf dem Chromosom 13 bei 13q12-q13 lokalisiert (NCBI, 2006). ALOX5AP ist das Gen eines Plasmamembran-gebundenen-Proteins, welches AA an sich bindet und damit eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von Arachidonsäure in die einzelnen Stoffe des Eikosanoidstoffwechsel darstellt.

Durch die Belastung war eine erhöhte Expression von ALOX5AP sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten zu verzeichnen. Eine signifikante Abhängigkeit vom Trainingszustand existiert nicht. Das ALOX5AP stieg bei den

Trainierten signifikant von 0,21 ($\pm 0,24$) in Ruhe auf 0,85 ($\pm 0,36$) 45' nach der Belastung an. Bei den Untrainierten erhöhte sich ALOX5AP signifikant um 0,7.

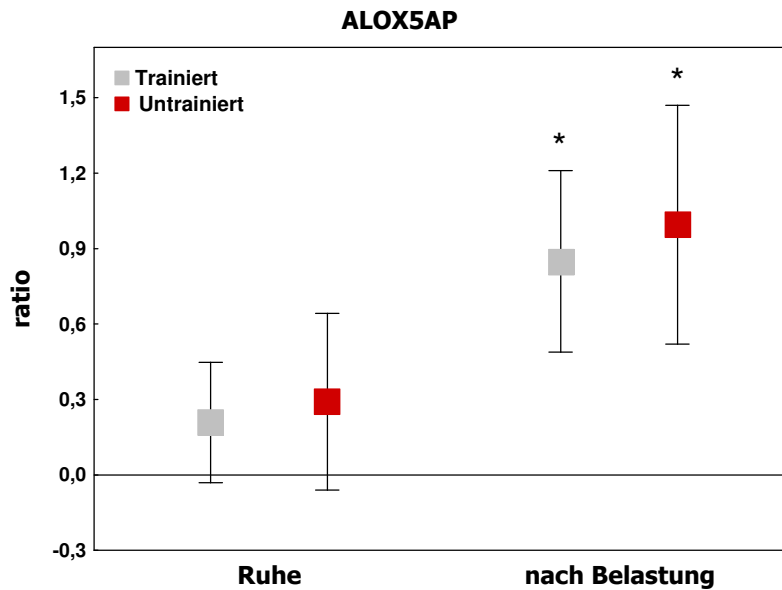


Abbildung 31: Veränderung der Genexpression von ALOX5AP (* = $p \leq 0,05$)

4.7.3 Leukotrien B₄ Rezeptor (LTBR)

LTB₄ R ist der Rezeptor für LTB₄, der synonym auch als BLT Rezeptor bezeichnet wird. Das Gen, das den Leukotrien B₄ Rezeptor kodiert besteht aus 3.635 Basen. Die cDNA kodiert 352 Aminosäurepolypeptide, mit einem geschätzten Gewicht von 43 kDa (NCBI, 2006). Dieser Rezeptor wird vor allem von Leukozyten und unterschiedlichen Geweben des Immunsystems exprimiert und ist in die Regulation der Inflammation und der Immunantwort involviert.

Durch die Belastung kommt es bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten zu einer Abnahme der Expression des LTB₄-Rezeptors. Diese belastungsinduzierte Reduktion ist jedoch nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind sowohl vor, als auch nach der Belastung ebenfalls nicht signifikant.

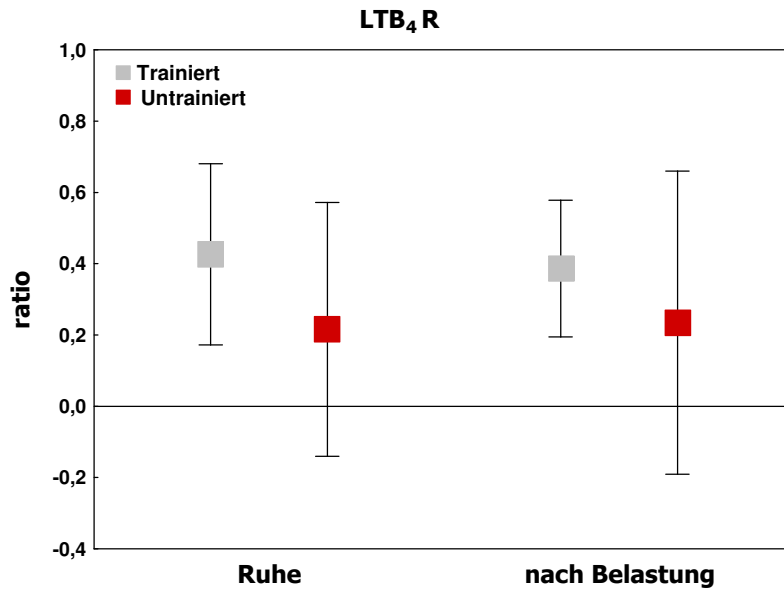


Abbildung 32: Veränderung der Genexpression des LTB₄ Rezeptors

4.7.4 IL-1R1 und IL-1R2 (Interleukin 1 Rezeptor 1 und 2)

Das Protein, das von diesem Gen enkodiert wird, ist ein Zytokin Rezeptor, der zur Interleukin 1 Superfamilie gehört. Dieses Protein ist ein Rezeptor für Interleukin alpha (IL-1 α), Interleukin beta (IL-1 β) und Interleukin Rezeptor Typ I (IL-1R1/IL-1R2). Es ist ein wichtiger Mediator, der in viele zytokin-induzierte Immun- und inflammatorische Reaktionen involviert ist. Zusammen mit dem Interleukin 1 Rezeptor Typ II (IL-1R2), dem Interleukin 1 Rezeptor-like 1 (IL-1RL1) bildet dieses Gen einen Zytokin Rezeptor Gen Cluster auf der Chromosom-Lokalisation 2q12. Die DNA von IL-1R1 hat eine Länge von 25.933 bp und besteht aus 570 Aminosäuren. Die IL-1R2 DNA besteht aus 36.577 bp und 399 Aminosäuren.

Interleukin 1 hat eine wichtige Rolle als Mediator bei der Inflammation. Aktuell existieren zwei separate, aber verwandte Proteine, IL-1alpha und IL-1beta. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelloberflächenrezeptoren für beide Isotypen identisch sind.

Durch die Belastung kam es zu einer vermehrten Expression von IL-1R1 und IL-1R2. Bei den Trainierten und den Untrainierten kam es zu einem signifikanten Anstieg von -0,18 ($\pm 0,18$) und -0,20 ($\pm 0,17$) auf -0,01 ($\pm 0,21$) und -0,00 ($\pm 0,21$) beim IL-1 Rezeptor 1. Der Interleukin 1 Rezeptor 2 änderte sich ebenfalls in Abhängigkeit von der Belastung signifikant. Bei den Trainierten kam es zu einer signifikanten Zunahme um 0,45 und bei den Untrainierten zu einer signifikanten Zunahme um 0,30.

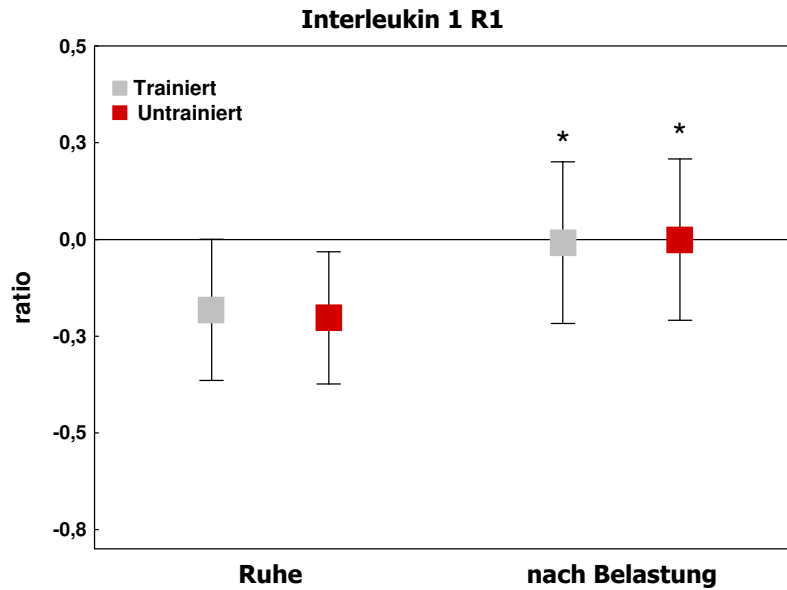


Abbildung 33: Veränderung der Genexpression von IL-1R1 (* = $p \leq 0,05$)

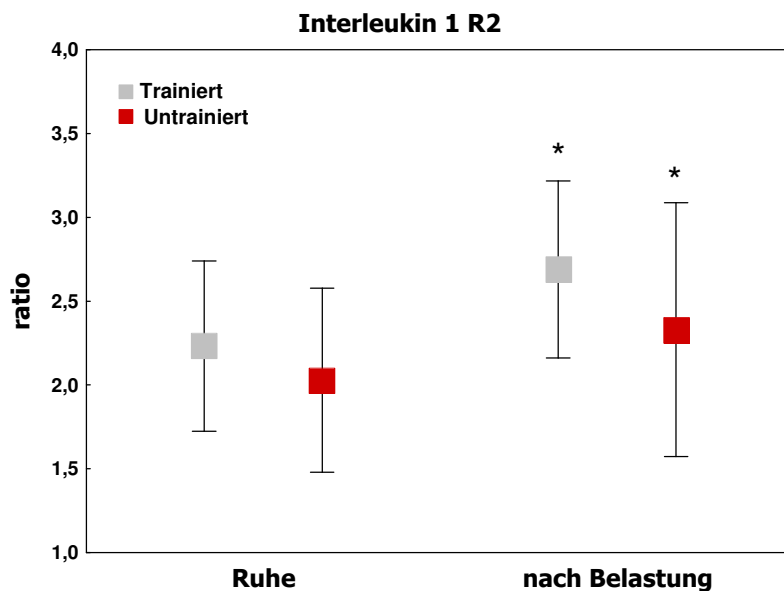


Abbildung 34: Veränderung der Genexpression von IL-1R2 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.5 TNF (Tumor Nekrose Faktor Superfamily, member 2)

Dieses Gen encodiert ein multifunktionales inflammatorisches Zytokin, dass zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren gehört. Dieses Zytokin wird in erster Linie von Makrophagen sezerniert. Es kann sich an zwei Rezeptoren binden (TNFRSF1A/TNFR1 und TNFRSF1B/TNFR2). Das Zytokin ist in ein weites Spektrum biologischer Prozesse, insbesondere Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Lipid-Stoffwechsel und Koagulation involviert.

TNF ist auf dem Chromosom 6 bei 6p21.3 lokalisiert. TNF hat eine Länge von 2763 bp und 234 Aminosäuren (NCBI, 2006).

Die mRNA des Tumor Nekrose Faktor alpha änderte sich infolge der Belastung signifikant. Bei den Trainierten stieg er signifikant von $-0,37 (\pm 0,23)$ auf $-0,22 (\pm 0,21)$ nach Belastung. Die Untrainierten hatten infolge der Belastung eine um 0,9 erhöhte Expression des TNF- α .

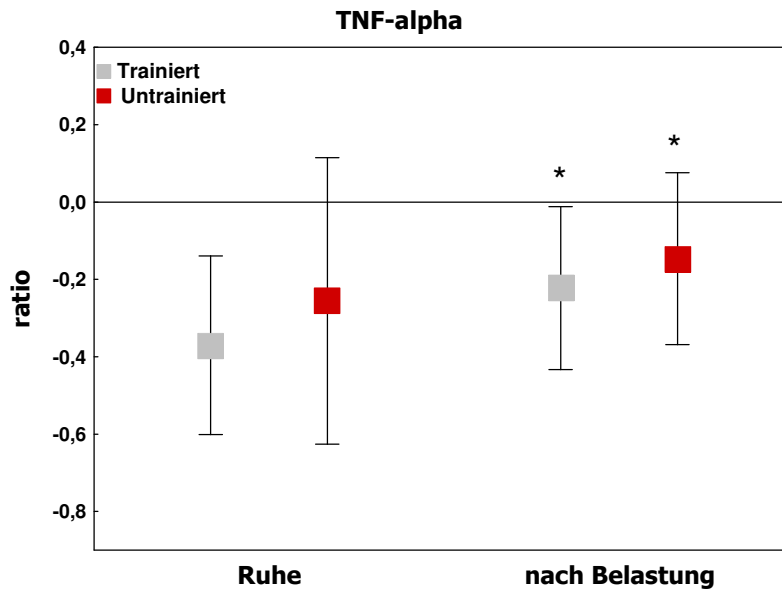


Abbildung 35: Veränderung der Genexpression von TNF- α (* = $p \leq 0,05$)

4.7.6 RANTES (CCL5)

RANTES (REGULATED UPON ACTIVATION, NORMALLY T-EXPRESSED, AND PRESUMABLY SECRETED) gehört zur Gruppe der Chemokine und spielt insbesondere als HIV-Suppressor eine wichtige Rolle.

Das Gen RANTES hat ein Molekulargewicht von 9,9 kDa, eine DNA Größe von 8.881 Basenpaaren, besteht aus 91 Aminosäuren und hat 3 Exons (NCBI, 2006).

Die gemessene mRNA von RANTES änderte sich in Abhängigkeit von der Belastung signifikant, zeigte aber keine Abhängigkeiten vom Trainingzustand. Bei den Trainierten kam es infolge der Belastung zu einer signifikanten Abnahme der Expression von RANTES von $0,64 (\pm 0,33)$ auf $-0,09 (\pm 0,52)$ und bei den Untrainierten verringerte sich die Expression ebenfalls signifikant von $0,73 (\pm 0,40)$ auf $0,00 (\pm 0,41)$.

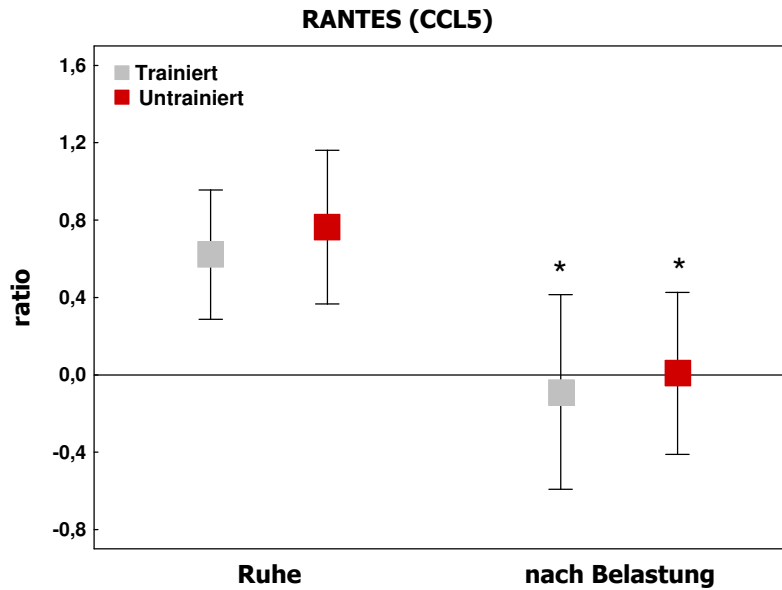


Abbildung 36: Veränderung der Genexpression von RANTES (CCL5) (* = $p \leq 0,05$)

4.7.7 IL-8 (Interleukin 8)

Interleukin 8 gehört wie CCL5 zur Gruppe der Chemokine. Chemokine spielen eine fundamentale Rolle in der Entwicklung, Hämostase und Funktion des Immunsystems. Interleukin 8 ist ein Gewebepeptid, welches von verschiedenen Typen von Zellen, als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus sezerniert wird. Das IL-8 Gen hat ein Molekulargewicht von 11,1 kDa, eine DNA Größe von 3.157 bp, besteht aus 100 Aminosäuren und hat 4 Exons. IL-8 ist auf dem Chromosom 4 bei 4q12-p21 lokalisiert (NCBI, 2006).

Interleukin 8 änderte sich signifikant in Abhängigkeit von der Belastung, zeigte aber keine Abhängigkeit vom Trainingszustand. Die Expression von IL-8 erhöhte sich bei den Trainierten signifikant von -2,16 (0,34) auf -1,76 (0,40). Bei den Untrainierten nahm die Expression signifikant zu, sie stieg von -1,96 (0,26) auf -1,55 (0,57).

IL-8 gilt als pro-inflammatorisches Zytokin, welches vorrangig für die Aktivierung und Migration von Neutrophilen vom peripheren Blut in das Gewebe verantwortlich ist.

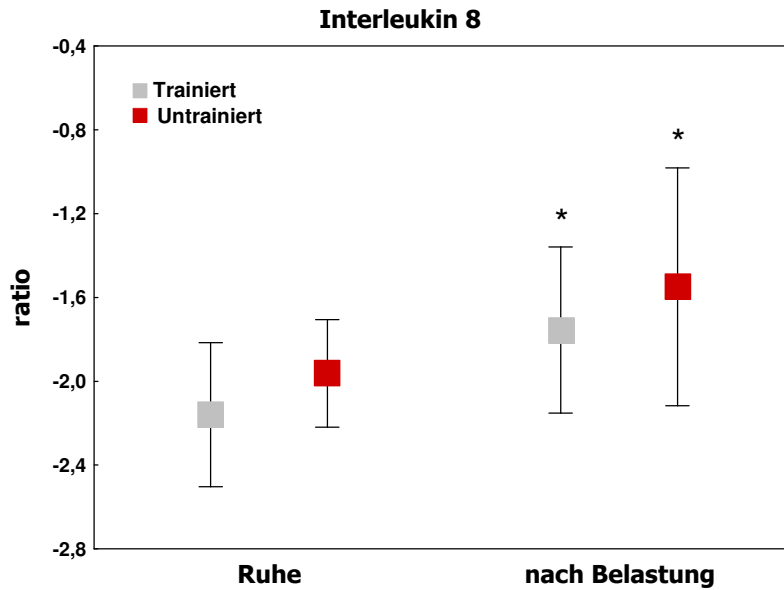


Abbildung 37: Veränderung der Genexpression von Interleukin 8 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.8 IL-2RA/ IL-2RG (Interleukin 2 Rezeptor alpha und gamma)

Die Aktivierung des T-Zellwachstumsfaktors IL-2 bedarf der Präsenz eines Zelloberflächenrezeptors. Der IL-2 Rezeptor ist ein Heterodimer, das aus einer alpha- und einer beta-Kette besteht.

Das IL-2RA Gen hat ein Molekulargewicht von 30,8 kDa, eine DNA Größe von 50.766 bp und besteht aus 272 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom 10 bei 10p15-p14 lokalisiert (NCBI, 2006).

Das IL-2RG Gen kodiert die Gamma-Untereinheit des Interleukin 2 Rezeptors. IL-2RG hat ein Molekulargewicht von 42,3 kDa, eine DNA Größe von 4.144 bp und besteht aus 369 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom X bei Xq13.1 lokalisiert (NCBI, 2006).

Infolge der Belastung kam es sowohl bei den Trainierten, als auch bei den Untrainierten zu einer Herunterregulierung der Expression der Interleukin 2 Rezeptoren alpha und gamma. Die Expression des Interleukin 2 Rezeptor alpha verringerte sich bei den Trainierten signifikant von 0,36 ($\pm 0,29$) auf 0,08 ($\pm 0,30$) und bei den Untrainierten von 0,24 ($\pm 0,33$) auf 0,09 ($\pm 0,26$). Die Expression des Interleukin 2 Rezeptor gamma verringerte sich bei den Trainierten von 0,99 ($\pm 0,19$) auf 0,80 ($\pm 0,35$) und bei den Untrainierten kam es zu einer signifikanten Abnahme um 0,21.

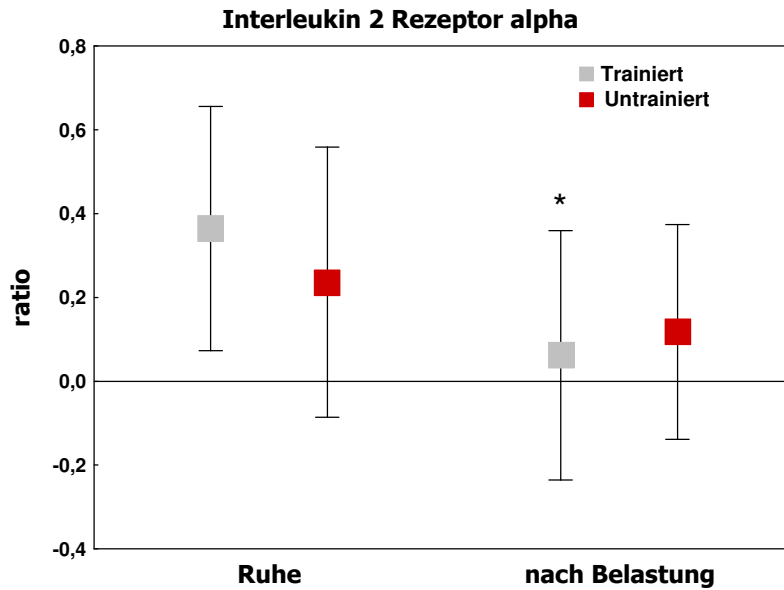


Abbildung 38: Veränderung der Genexpression von IL-2RA (* = $p \leq 0,05$)

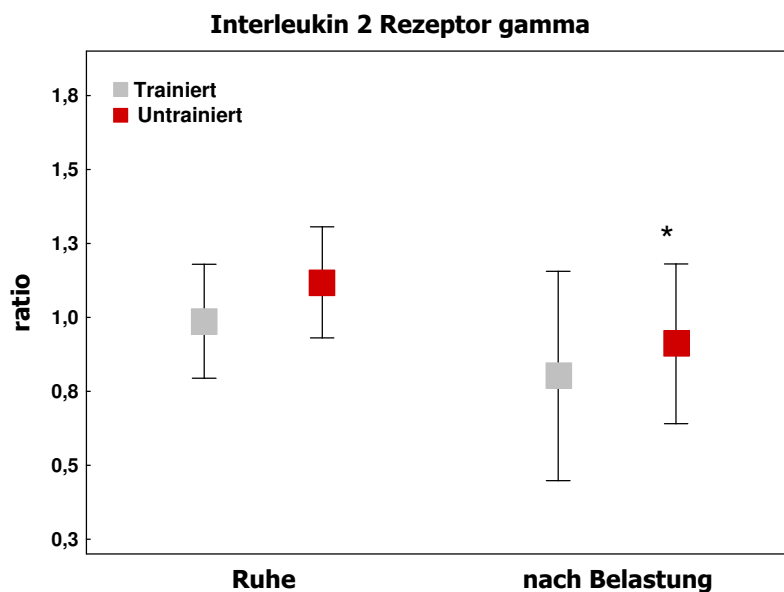


Abbildung 39: Veränderung der Genexpression von IL-2RG (* = $p \leq 0,05$)

4.7.9 IL-10 RA (Interleukin 10 Rezeptor alpha)

Interleukin 10 ist ein Zytokin, welches von B-Zellen, T-Helfer-Zellen und von Zellen der Monozyten/ Makrophagen Zelllinie produziert wird. Es appliziert diverse Aktivitäten verschiedener Zelllinien. IL-10 hemmt die Makrophagen Aktivität durch IFN-gamma. Das IL-10RA Gen hat ein Molekulargewicht von 62,9 kDa, eine DNA Größe von 15.085 bp und besteht aus 578 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom 11 bei 11q23 lokalisiert (NCBI, 2006).

Die Ausdauerbelastung führte zu einer signifikanten Veränderung der Expression von Interleukin 10RA. Bei den Trainierten führte es zu einer Abnahme der Expression von 0,28 ($\pm 0,18$) auf 0,20 ($\pm 0,23$). Bei den Untrainierten reduzierte sich die Expression signifikant um 0,23.

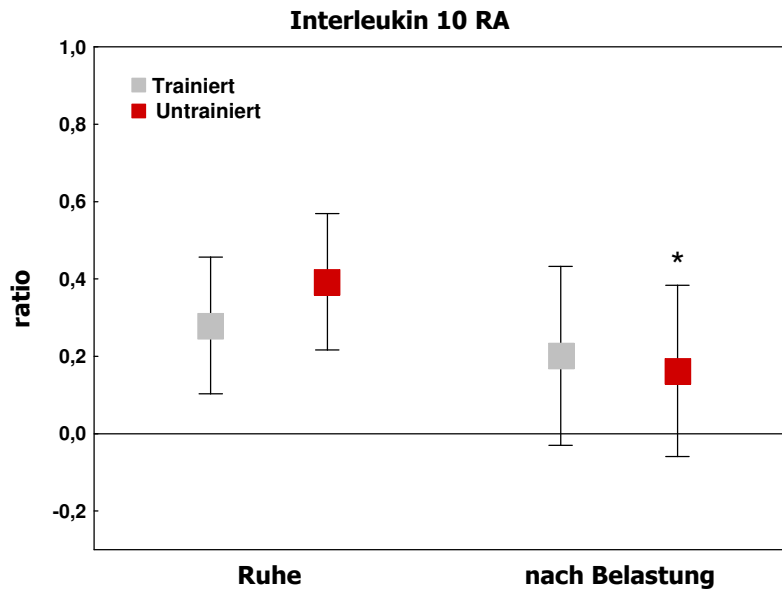


Abbildung 40: Veränderung der Genexpression von IL-10RA (* = $p \leq 0,05$)

4.7.10 IL-13RA (Interleukin 13 Rezeptor, alpha1)

Interleukin 4 und Interleukin 13 sind zwei Zytokine, die von aktivierten T-Zellen gebildet werden und ähnliche Effekte auf Monozyten und B-Zellen haben. Eine schwache IL-13 Bindungsaktivität wurde in Zellen nachgewiesen, die nur mit dem IL-13RA transfiziert wurden, jedoch die Kombination von IL-4RA und IL-13RA resultierte in einer beträchtlichen Bindungsaktivität. Ein Indiz dafür, dass beide Ketten essentielle Komponenten für den IL-13R sind.

Die DNA von IL-13RA hat ein Molekulargewicht von 48,8 kDa, eine DNA Größe von 66.937 bp und besteht aus 427 Aminosäuren. Es ist auf dem X-Chromosom bei Xq24 lokalisiert (NCBI, 2006).

Das Allgemeine lineare Modell mit Messwiederholung zeigte keine signifikante Veränderung der Expression des Interleukin 13 Rezeptor alpha1 in Abhängigkeit von der Belastung oder dem Trainingszustand. In Ruhe lag der IL-13RA1 bei den Trainierten im Mittel bei -0,36 ($\pm 0,20$) und fiel auf -0,45 ($\pm 0,26$) und bei den Untrainierten reduzierte er sich von -0,27 ($\pm 0,21$) auf -0,34 ($\pm 0,22$).

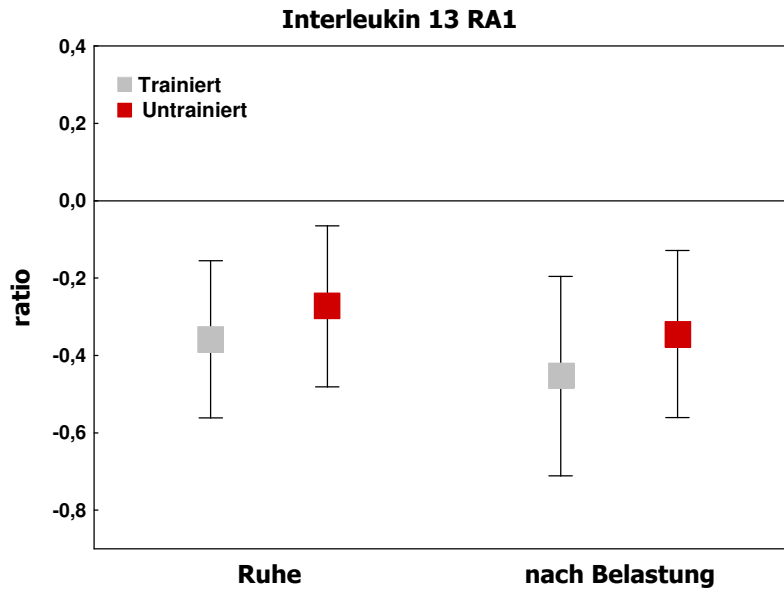


Abbildung 41: Veränderung der Genexpression von IL-13RG

4.7.11 GM-CSF (Granulozyten – Monozyten Colony-stimulating-factor)

Colony-stimulating factors sind notwendig für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Sie werden nach den Zellen benannt, die sie stimulieren. GM-CSF stimuliert demzufolge Granulozyten und Monozyten.

GM-CSF hat ein Molekulargewicht von 16,3 kDa, eine DNA Größe von 2.374 Basen und besteht aus 144 Aminosäuren (NCBI, 2006).

Infolge der Belastung kam es zu einer signifikanten Zunahme der Expression der mRNA von GM-CSF. Bei den Trainierten kam es zu einer signifikanten Zunahme der Expression von -0,04 ($\pm 0,17$) auf 0,14 ($\pm 0,23$) und bei den Untrainierten ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme von 0,09 ($\pm 0,25$) auf 0,06 ($\pm 0,20$).

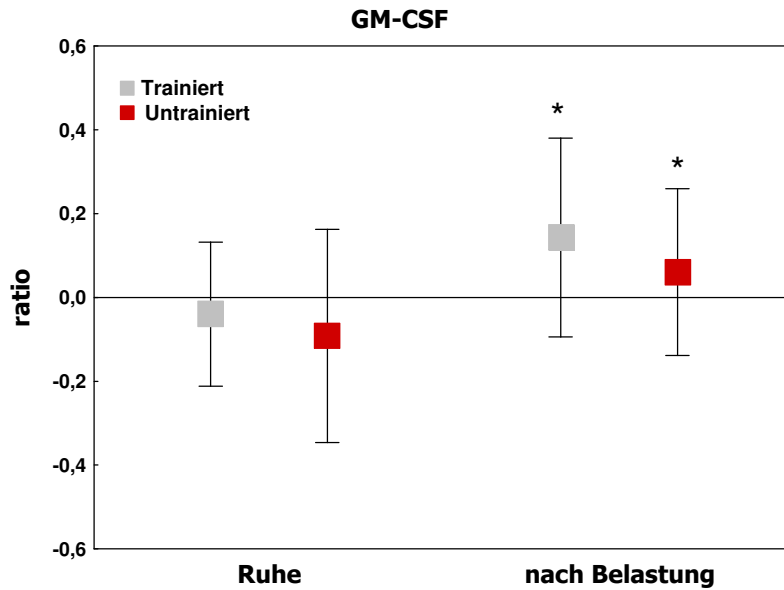


Abbildung 42: Veränderung der Genexpression von GM-CSF (* = $p \leq 0,05$)

4.7.12 Prostaglandin Synthasen 1 und 2 (PTGS1 und PTGS2)

Prostaglandine ist ein Sammelbegriff für Gewebshormone, die chemisch aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet werden - die einzelnen Vertreter sind eine Unterklasse der Eikosanoide. Wichtigste Quelle ist die Arachidonsäure (C20:4), die über Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden freigesetzt wird.

Chemisches Grundgerüst der Prostaglandine ist die Prostansäure, eine Carbonsäure mit 20 C- Atomen. Man unterscheidet mehrere Gruppen von Prostaglandinen, welche sich durch den Oxidationsgrad der C- Atome 9 und 11 unterscheiden (Ketone, Dirole Ketole etc.) Ferner sind zahlreiche Untergruppen bekannt. Die Zahl der im Molekül vorhandenen Doppelbindungen wird durch einen Index am Gruppennamen angegeben. Prostaglandine modulieren second messenger Systeme. Ihre Wirkung ist überaus divers. Das Schlüsselenzym ihrer Synthese, Cyclooxygenase, ist durch Acetylsalicylsäure (z. B. Aspirin) und viele andere Schmerzmittel hemmbar.

Prostaglandin – Endoperoxid – Synthase (PTGS), auch bekannt als Cyclooxygenase (COX), ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin Biosynthese und agiert sowohl als Dioxygenase, wie auch als Peroxidase. Es existieren zwei Isoformen der PTGS: das konstitutive PTGS1 und das induzierte PTGS2, welche sich in der Regulation der Expression und ihrer Verteilung im Gewebe unterscheiden.

PTGS1:

Die Cyclooxygenase-Aktivität des Enzyms kann durch nonsteroidale anti-inflammatorische Medikamente wie Aspirin oder Endomethazin gehemmt werden.

PTGS1 hat ein Molekulargewicht von 68,7 kDa, eine DNA Größe von 24.752 bp und besteht aus 599 Aminosäuren. Es liegt auf dem Chromosom 9 und ist bei 9q32-q33.3 lokalisiert (NCBI, 2006).

Die mRNA der Prostaglandin Synthase 1 zeigte eine hochsignifikante Abhängigkeit sowohl von der Belastung, als auch vom Trainingszustand. Durch die Belastung kam es zu einer Abnahme der Expression bei den Trainierten und bei den Untrainierten. Bei den Trainierten reduziert sich die Expression signifikant von -0,20 ($\pm 0,26$) auf -0,49 ($\pm 0,28$) und bei den Untrainierten kam es zu einer signifikanten Reduktion von 0,01 ($\pm 0,21$) auf 0,13 ($\pm 0,24$). Die beiden Gruppen unterschieden sich sowohl in Ruhe als auch nach der Belastung signifikant voneinander.

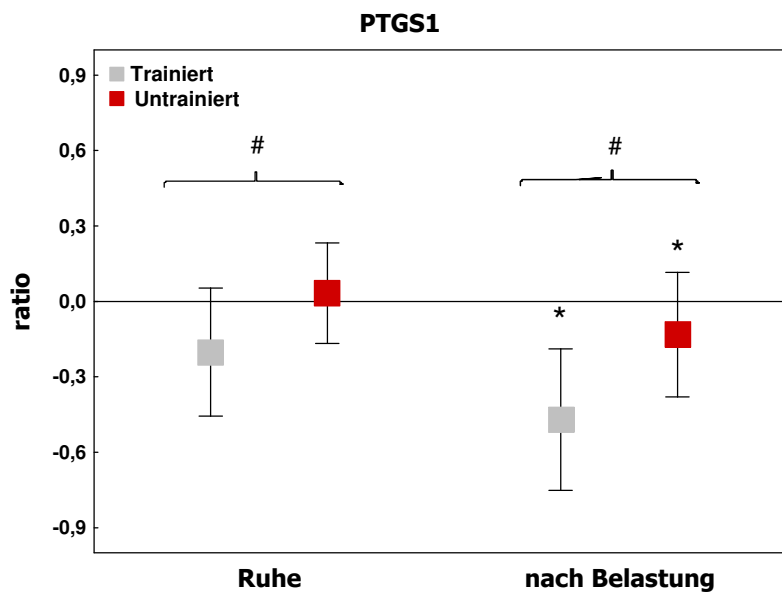


Abbildung 43: Veränderung der Genexpression von PTGS1 (* = belastungsinduzierte Veränderungen $p \leq 0,05$; # = trainingsinduzierte Veränderungen $p \leq 0,05$)

PTGS2:

PTGS2 steht in erster Linie im Zusammenhang mit biologischen Ereignissen, wie Verletzung, Inflammation und Proliferation. Das Gen hat ein Molekulargewicht von 69,0 kDa, eine DNA Größe von 8.587 bp und besteht aus 604 Aminosäuren. Es liegt auf dem Chromosom 1 und ist bei 1q25.2-q25.3 lokalisiert (NCBI, 2006).

Die mRNA des PTGS2 änderte sich signifikant in Abhängigkeit von der Belastung, zeigte aber keine Abhängigkeit vom Trainingszustand. Die Expression von PTGS2 erhöhte sich bei den Trainierten signifikant von 0,86 ($\pm 0,23$) auf 1,19 ($\pm 0,33$). Bei den Untrainierten nahm die Expression signifikant zu, sie stieg von 0,84 ($\pm 0,37$) auf 1,06 ($\pm 0,32$).

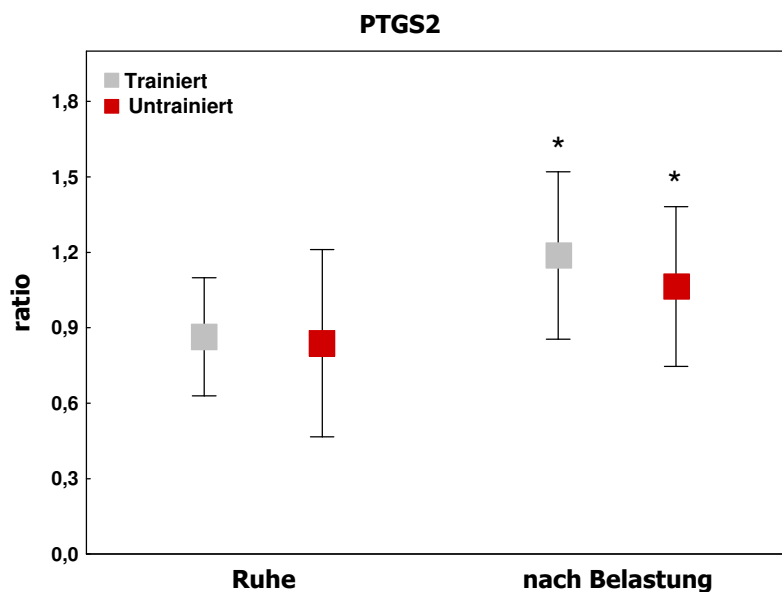


Abbildung 44: Veränderung der Genexpression von PTGS2 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.13 TBXAS1 (Thromboxane A Synthase 1)

Die Thromboxan Synthase, ein zytochromes P450 Enzym, katalysiert die Umwandlung von Prostaglandin Endoperoxid zu Thromboxan A₂, einem wichtigen Vasokonstriktor und Auslöser der Plättchenaggregation. Zusammen mit Prostacyclin spielt Thromboxan A₂ eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Hämostase. Das Gen hat ein Molekulargewicht von 60,5 kDa, eine DNA Größe von 191.050 bp und besteht aus 533 Aminosäuren. Es befindet sich auf dem Chromosom 7 und ist bei 7q34-q35 lokalisiert (NCBI, 2006).

Die mRNA der Thromboxan A Synthase1 zeigte ebenfalls eine signifikante Abhängigkeit von der Belastung. Trainierte und Untrainierte reagierten mit einer

Abnahme der Expression. Bei den Trainierten reduzierte sich die TBXAS1 signifikant von 0,98 ($\pm 0,28$) auf 0,74 ($\pm 0,33$). Die Untrainierten erreichten nach der Belastung Werte von 0,76 ($\pm 0,27$) ausgehend von 0,88 ($\pm 0,32$) in Ruhe.

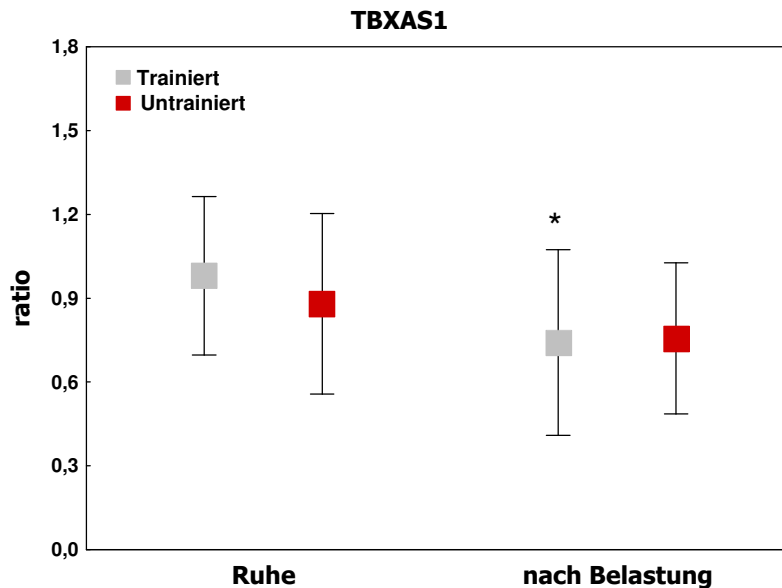


Abbildung 45: Veränderung der Genexpression von TBXAS1 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.14 MAPK14 (mitogen activated protein kinase 14)

Die MAPK14 wird auch als p38MAPK bezeichnet und reagiert infolge der Aktivierung durch Umwelteinflüsse, pro-inflammatorischen Zytokine, Lipopolysaccharide mit Phosphorylierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise ELK1, und einigen downstream Kinasen, wie MAPKAPK2 oder MAPKAPK5. MAPK14 spielt eine kritische Rolle in der Produktion von einigen Zytokinen, z.B. IL-6 und wird durch die Threonin- und Tyrosinphosphorylierung über eine von zwei spezifischen Kinasen MAP2K3 oder MAP2K6, aber ebenso über MAP2K4 aktiviert.

Das Gen MAPK14 hat ein Molekulargewicht von 41,2 kDa, eine DNA – Größe von 82.962 bp und besteht aus 359 Aminosäuren. MAPK14 liegt auf dem Chromosom 6 und ist dort bei 6p21.3-p21.2 lokalisiert (NCBI, 2006).

Die mRNA der MAPK14 zeigte ebenfalls eine signifikante Abhängigkeit von der Belastung. Trainierte und Untrainierte reagierten mit einer Zunahme der Expression. Bei den Trainierten erhöhte sich die MAPK14-Expression signifikant von -0,57 ($\pm 0,23$) auf -0,31 ($\pm 0,35$). Die Untrainierten erreichten nach der Belastung Werte von 0,13 ($\pm 0,35$) ausgehend von -0,51 ($\pm 0,20$) in Ruhe. Die Veränderung war ebenfalls signifikant.

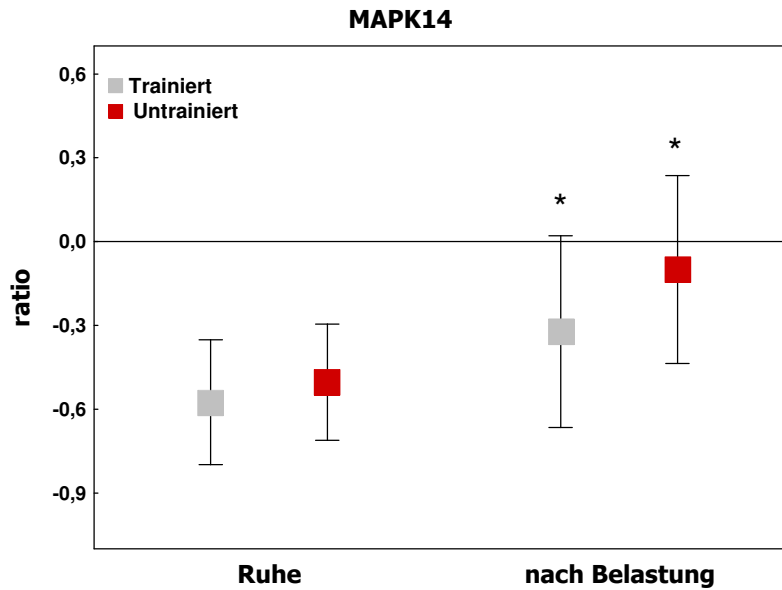


Abbildung 46: Veränderung der Genexpression von MAPK14 (* = $p \leq 0,05$)

4.7.15 HRH1 (Histamin Rezeptor H1)

Histamin ist ein biogenes Amin, das aus der Aminosäure Histidin gebildet wird und insbesondere in Mastzellen, basophilen Granulozyten und Nervenzellen gespeichert wird. Es wird in Mastzellen, Zellen der Epidermis und der Magenschleimhaut und in Nervenzellen synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. In diesen Zellen wird Histamin aus der Aminosäure Histidin durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylierung mittels des Enzyms Histidindecarboxylase in einer Ein-Schritt-Reaktion gebildet.

Histamin wird im Körper bei IgE-vermittelten allergischen Reaktionen ("Soforttyp", Typ I) oder durch Komplementfaktoren (z.B. bei Schock durch Endotoxine) vor allem aus Mastzellen freigesetzt. Auch Gewebshormone, wie z.B. Gastrin und Medikamente, wie z.B. Opiate und Röntgenkontrastmittel können eine Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen hervorrufen.

Der Histamin – Rezeptor H1 enkodiert einen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor, welcher diverse neuronale und periphere Reaktionen der Histamine vermittelt. Er wird von T-Helfer-Lymphozyten, in erster Linie von TH₁-Zellen exprimiert, wenn IL-3 hochreguliert ist und triggert dort unterschiedliche intrazelluläre Ereignisse.

Das HRH1 Gen hat ein Molekulargewicht von 55,8 kDa, eine DNA Größe von 10.015 bp und besteht aus 487 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom 3 bei 3p25 lokalisiert (NCBI, 2006).

In der vorgeschalteten Clusteranalyse wurde die mRNA von HRH1 bestimmt, welche eine signifikante Abhängigkeit vom Trainingszustand aufweist. Mittels des Allgemeinen-Linearen-Modells mit Messwiederholung konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit der mRNA des Histamin Rezeptors H1, weder von der Belastung, noch dem Trainingszustand nachgewiesen werden. Im T-Test zeigt sich allerdings ein signifikanter Unterschied der Expression von HRH1 in Ruhe in Abhängigkeit vom Trainingszustand.

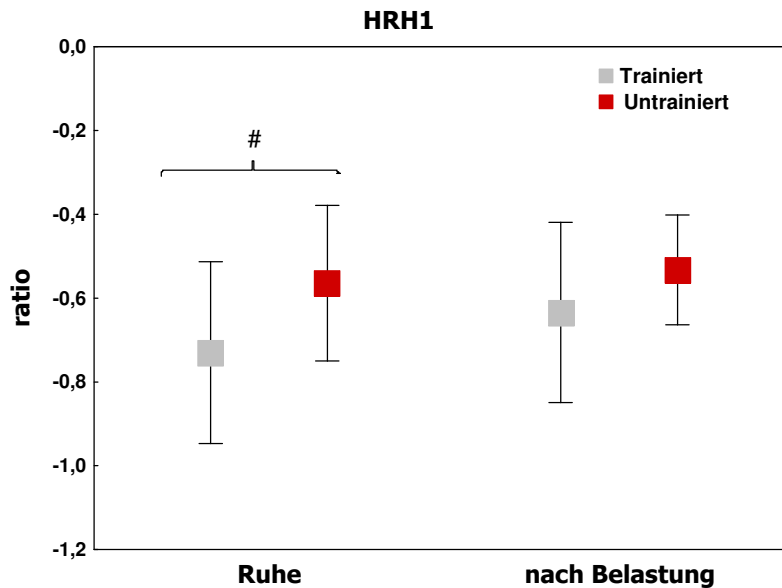


Abbildung 47: Veränderung der Genexpression von HRH1 (# = $p \leq 0,05$)

4.7.16 Übersichten, Netzwerke und Signaling zum Eikosanoidstoffwechsel

Dieses Kapitel soll Zusammenhänge im Eikosanoidstoffwechsel aufzeigen und die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Veränderungen im Zusammenhang darstellen.

Die Arachidonsäure wird über die Aktivität von 5-LO zu 5-HPETE umgewandelt (Abbildung 39). Durch die körperliche Belastung kommt es zu einer Hochregulation von ALOX5 und damit zur Aktivierung des Lipooxygenasestoffwechsels mit einer vermutlich vermehrten Bildung von Leukotrienen.

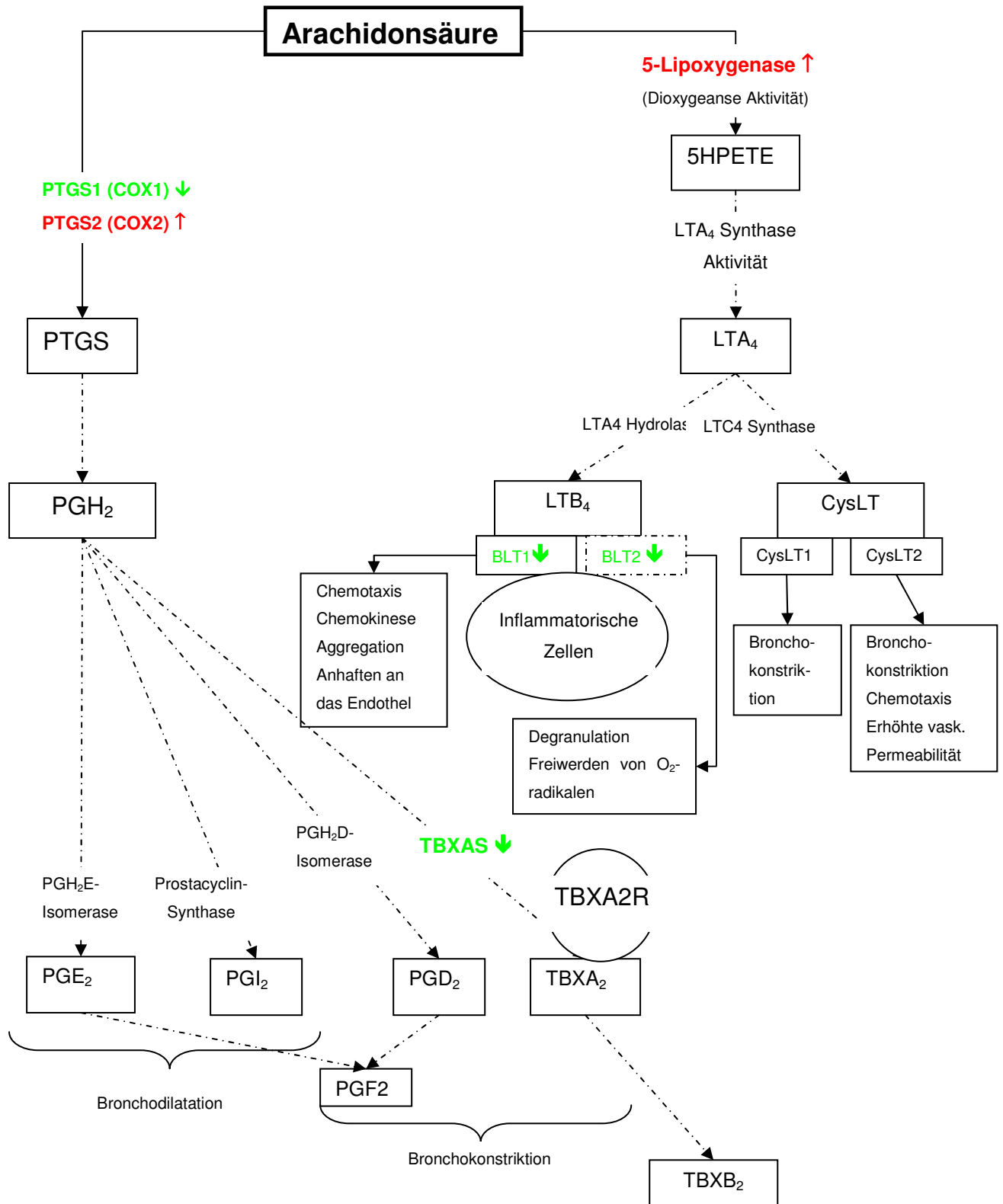


Abbildung 48: Cyclooxygenase- und Lipoxygenasestoffwechselweg und belastungs- bzw. trainingsinduzierte Veränderungen
 \downarrow = Abregulation
 \uparrow = Aufregulation

Die CysLTs sind die Schlüsselmediatoren und Modulatoren der systemischen allergischen Antwort und sind wichtige Komponenten der inflammatorischen Reaktion, die zu den typischen Symptomen des Asthmas wie Bronchokonstriktion und erhöhte Mukussekretion führen (Busse, W. & Kraft, 2005). Außerdem kommt es infolge der inflammatorischen Reaktion zur gesteigerten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, vor allem von TNF- α und des Interleukins IL-8. Des Weiteren wird die Cyclooxygenase1 (PTGS1) durch die Belastung in ihrer Expression gehemmt, was mit einer verminderten Produktion von Prostaglandin E₂ und damit verminderter bronchodilatativer Wirkung einhergehen kann (siehe Abbildung 48). Parallel dazu wird aber der Cyclooxygenaseweg über eine erhöhte Expression von PTGS2 aktiviert (siehe Abbildung 48). Zusätzlich kommt es zu einer verringerten Expression von TBXAS1 (siehe Abbildung 48). Die Konsequenzen dieser beiden Expressionsveränderungen bleiben noch im Unklaren.

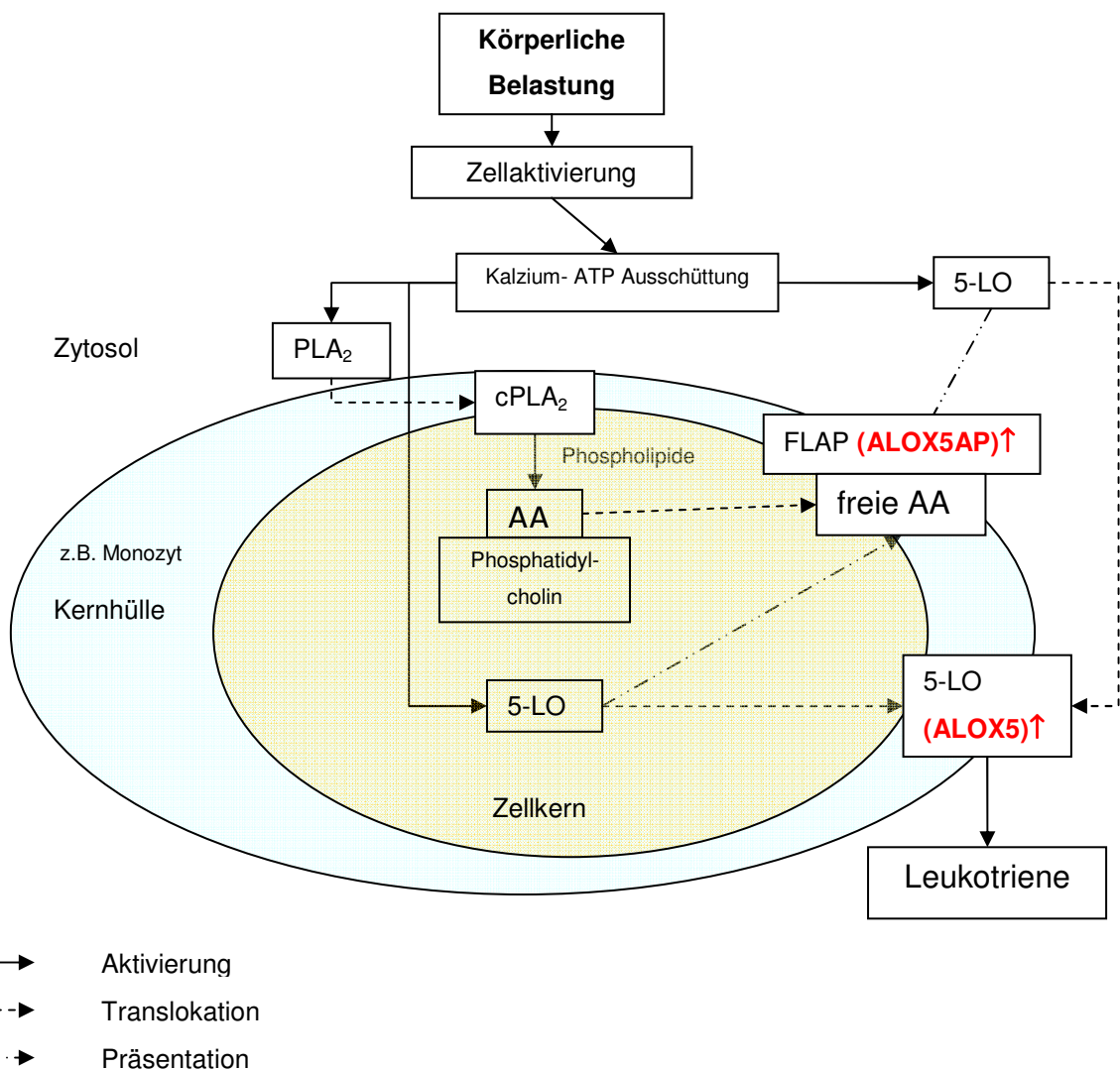


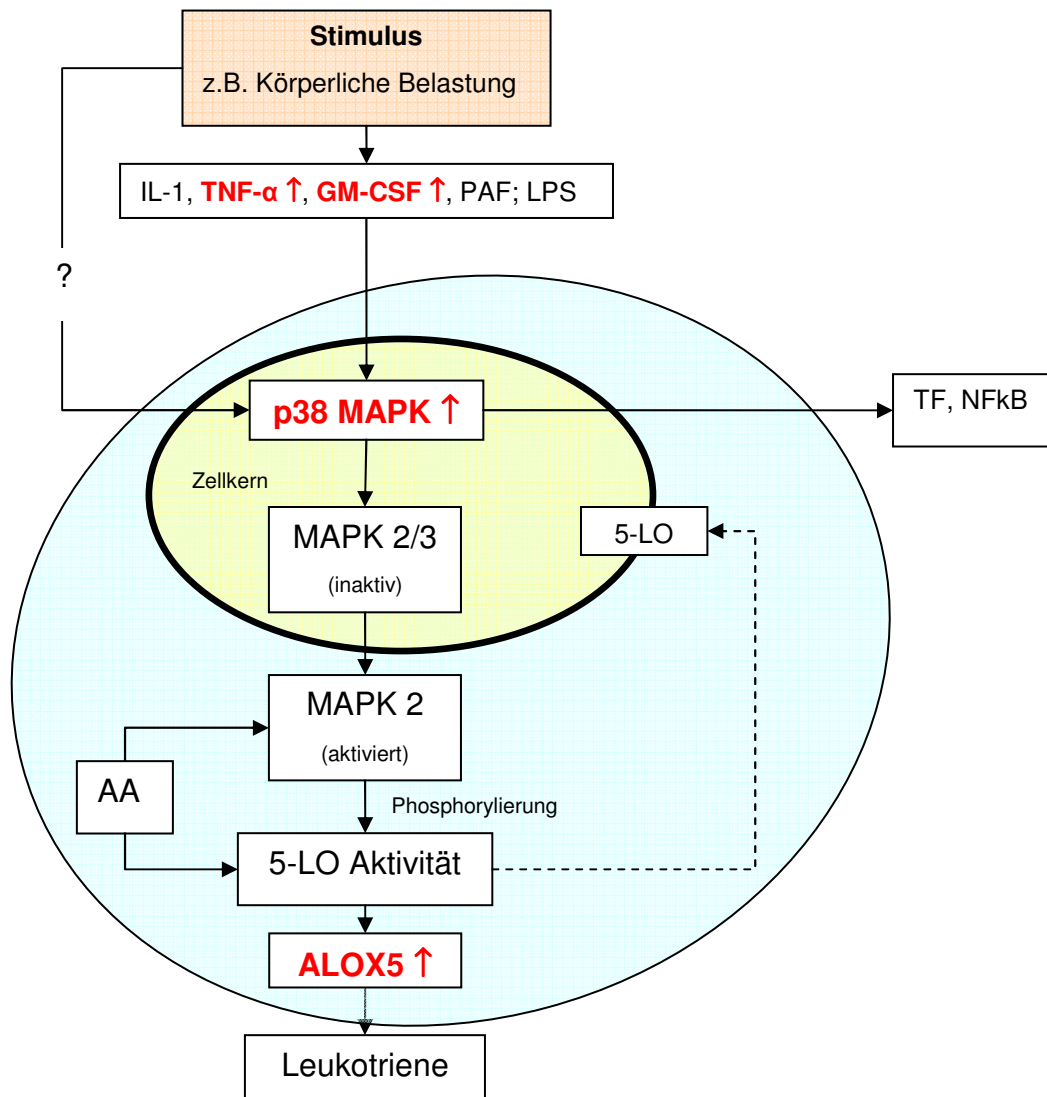
Abbildung 49: Genexpression nach körperlicher Belastung

Abbildung 49 verdeutlicht die Veränderungen im Leukotrien-Pathway nach körperlicher Belastung. Körperliche Belastung führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Mooren, Lechtermann et al., 2001). Die Phospholipase A₂ befindet sich in ruhenden Zellen im Zytosol und nach einer kalziumabhängigen Aktivierung der Zellen kommt es zu einer Translokation von cPLA₂ zur Kernhülle. Kalzium stimuliert die 5-LO Enzymaktivität und Membranassoziation (Hammarberg & Radmark, 1999). Die katalytische Aktivität von 5-LO wird außerdem über ATP und zu einem geringeren Anteil über andere Nukleotide stimuliert.

Die Lokalisierung von 5-LO in ruhenden Zellen differiert je nach Zelltyp. Es ist jedoch egal, ob sich das Enzym in ruhenden Zellen im Zytosol oder im Nukleus befindet, nach Zellaktivierung kommt es immer zu einer Verschiebung zur Kernhülle (Brock, McNish & Peters-Golden, 1995; Peters-Golden, 1998; Woods et al., 1993). Das FLAP hat die Aufgabe die Arachidonsäure (AA) zu binden. FLAP scheint damit als ein Arachidon-Transfer-Protein zu dienen, dass die Präsentation von Substraten für 5-LO fördert und damit für eine optimale Synthese von LTA₄ sorgt (Abramovitz et al., 1993). Die Präsentation von AA über FLAP führt außerdem zur Translokation zur Kernmembran.

In der vorliegenden Studie konnte infolge der Belastung eine erhöhte Expression der mRNA sowohl von 5-LO als auch von FLAP nachgewiesen werden, was zu einer Aktivierung des Leukotrienstoffwechsels führt.

Die körperliche Belastung führte aber nicht nur zu einer erhöhten Expression leukotrien-relevanter Gene, vielmehr wurde auch das zentrale Enzym in seiner Aktivität verändert.



- > Aktivierung
- - - - -> Translokation

Abbildung 50: Aktivierung der 5-LO

Der Export von 5-LO aus dem Zellkern steht im Zusammenhang mit einer Aktivierung der p38MAPK (Hanaka et al., 2005). Die moderate Ausdauerbelastung löste in der vorliegenden Studie eine starke Expression der p38MAPK aus und führte damit zu einer möglichen Aktivierung von 5-LO (Abbildung 45). Die Lokalisation von 5-LO ist dabei abhängig vom Import – Export Gleichgewicht des nuklearen Transportsystems (Hanaka et al., 2005). Die Translokation von 5-LO zur Kernhülle setzt das Freiwerden von AA voraus (Flamand et al., 2006). Das bestätigt die Beobachtung, dass unter physiologischen Bedingungen die Arachidonsäure eine Schlüsselrolle in der zellulären Lokalisation von 5-LO in menschlichen Neutrophilen spielt. Allerdings ist

noch unklar, ob infolge der Translokation die 5-LO aus dem Zytosol an die Zellmembran auf der Seite des Zytoplasmas bindet, oder ob sie in den Zellkern eindringt um dann dort an die Membran zu binden (Werz, 2002).

Signal Pathways, die die Mitogen-aktivierenden Protein Kinasen (MAPKs) aktivieren, sind in die Übertragung von extrazellulären Stimulationen auf intrazelluläre Antworten involviert. MAPKs regulieren die Zellproliferation, Differenzierung, Mobilität, und Überleben der Zellen. In stimulierten Leukozyten konnten zwei p38MAPK – regulierende MKs gefunden werden: MK2 und MK3 (Werz, 2002). Sie sind 5-LO Kinasen, die für die Phosphorylierung von 5-LO *in vitro* verantwortlich sind (Werz et al., 2000). Bei den drei Hauptgruppen der MAPKs wird die p38MAPKs durch eine Vielzahl von inflammatorischen Stimuli, chemotaktischen Faktoren und Kalzium-mobilisierenden Faktoren aktiviert. Außerdem kommt es als Antwort auf verschiedene zelluläre Stresse, wie Hyperosmolarität, osmotischer Schock, gentoxischer Stress, UV-Licht und Hitzeschock zu einer schnellen Aktivierung (Werz, Bürkert, Samuelsson et al., 2002). Nach der Hypothese von Hanaka et al. (2005) wird p38MAPK durch einen Stressstimulus phosphoryliert und die aktivierte p38MAPK in den Zellkern importiert um MK2 zu phosphorylieren. MK2 in seiner inaktiven Form kommt hauptsächlich im Nukleus vor und seine stress-induzierte Aktivierung geschieht parallel zum Export ins Zytoplasma (Engel, Kotlyarov & Gaestel, 1998).

5 Diskussion

In der nachfolgenden Diskussion werden zunächst die Leistungsdaten analysiert.

Im Weiteren erfolgt die Interpretation der zellulären Veränderungen zunächst anhand der veränderten Zellzahlen und dann der Genexpressionsveränderungen nach akuter körperlicher Belastung, Ausdauertraining bzw. der Kombination aus Beiden. Dabei wird der enge Bezug zum Asthma jeweils bei der Beschreibung der dargestellten Gene hergestellt. Ein Schwerpunkt wird auf die Veränderungen der Genexpression im Eikosanoidstoffwechsel gelegt. Ziel soll es dabei sein, die Genexpressionsveränderungen bei Gesunden in Verbindung mit körperlicher Belastung und Training im Kontext zu Asthma bzw. EIA kritisch zu diskutieren.

5.1 Leistungsphysiologische Voraussetzungen

Die Zuordnung zu den beiden Gruppen erfolgte anhand der relativen maximalen Sauerstoffaufnahme. Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max) ist die klassische Messgröße zur Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit, insbesondere der Ausdauerleistungsfähigkeit und bezeichnet die maximale Menge an Sauerstoff, die bei schwerer körperlicher Arbeit aufgenommen und verarbeitet werden kann. Sie gilt als Bruttokriterium der kardio-pulmonalen Leistungsfähigkeit. Bei Hochausdauertrainierten kann die maximale Sauerstoffaufnahme Werte bis 90 ml/kg/min betragen. Bei Werten >65 ml/min/kg kann von einer sehr guten Ausdauerleistungsfähigkeit ausgegangen werden. Nicht ausdauertrainierte gesunde Erwachsene erreichen in der Regel Werte zwischen 30 und 50 ml/min/kg (de Marées & Heck, 2002). Unser Probandengut unterschied sich hinsichtlich ihrer maximalen Sauerstoffaufnahme signifikant voneinander und konnten eindeutig einer untrainierten Gruppe ($\text{VO}_2\text{max} \leq 50$ ml/min/kg) bzw. einer trainierten Gruppe ($\text{VO}_2\text{max} \geq 65$ ml/min/kg) zugeteilt werden. Die trainierten Probanden kamen überwiegend aus deutlich ausdauerorientierten Sportarten, wie Triathlon, Radsport oder Laufen, während die Untrainierten keiner regelmäßigen sportlichen Tätigkeit nachgingen. Das lässt sich auch mit Hilfe des relativen Herzvolumens belegen. Untrainierte Männer haben hier im Mittel ein relatives Herzvolumen von 10,5 ml/kg (vgl. 10,3 ml/kg). Als untere

Grenze für das Vorliegen eines Sportherzens wird ein relatives Herzvolumen von 13,0 ml/kg (vgl. 13,1 ml/kg) bei Männern angenommen (de Marées & Heck, 2003).

Um intra- und interindividuell vergleichbare Voraussetzungen für Belastungen mit unterschiedlichen Belastungsintensitäten im Dauerleistungsbereich zu schaffen sind die anaerobe Schwelle im Allgemeinen und die IAS im Speziellen gute Hilfsmittel. Die anaerobe Schwelle, ermittelt über die Laktatleistungskurve, repräsentiert das maximale Laktat-Steady-State. Sie ist die obere Grenze des aerob-anaeroben Übergangs und stellt einen physiologischen Breakpoint dar. Bei länger dauernden Belastungen oberhalb der anaeroben Schwelle steigt die Laktatkonzentration im Blut trotz konstanter Intensität an (Kindermann, 2004). Aus den Daten des Dauertests lässt sich gut erkennen, dass die Belastung bei 80% der IAS sowohl von den Trainierten als auch von den Untrainierten subjektiv gleich anstrengend eingestuft wurde. Objektiv lässt sich das über die Laktatwerte am Ende der Belastung belegen. Die Laktatwerte lagen da bei beiden Gruppen deutlich im vermehrt aeroben Bereich (Trainierte 2,2 mmol/l; Untrainierte 2,3 mmol/l) und unterschieden sich nicht signifikant in Abhängigkeit vom Trainingszustand. Auch hinsichtlich der Herzfrequenz unter Belastung ließ sich kein Unterschied in den Gruppen aufzeigen. Alle messbaren physiologischen Werte, die während des Dauertests aufgenommen wurden, zeigten eine für beide Gruppen vergleichbare moderate Ausdauerbelastung an. Die IAS war insofern eine gute Wahl zur Steuerung der Belastung. Bereits in vielen anderen Studien (z.B. (Gabriel, 2000) konnte nachgewiesen werden, dass eine Belastung in dieser Form gut geeignet ist, um immunologische Veränderungen, die durch körperliche Belastungen hervorgerufen werden, zu untersuchen. Die Dauer und der Umfang der Intensität zeigte schon in anderen Studien eine deutliche Reaktion der Akuten Phase Proteine und der inflammatorischen Zellen.

Zusammenfassend waren die 2 untersuchten Gruppen hinsichtlich ihrer Ausdauerleistungsfähigkeit deutlich unterschiedlich und das verwendete Belastungsregime für die Ausdauerbelastung mit 80% IAS über 90 min erwies sich als ideal geeignet.

5.2 Ergebnisse des Fragebogens

Die Prävalenz für EIA bei der allgemeinen Bevölkerung wird auf 4-20% und bei Leistungssportlern auf 11-50% geschätzt (Rundell, Im et al., 2001). Oftmals wird EIA bei Athleten anhand von selbstberichteten Symptomen eingeschätzt und/oder die

Atemwegsleistung wird über pharmakologische Untersuchungen oder Belastungsuntersuchungen gemessen.

Einige Studien untersuchten nicht einmal die Symptome, die bei EIA bei Leistungssportlern auftraten. Bisher sind oftmals selbstberichtete Symptome die Basis für die Diagnostik von EIA. Derzeit existieren auch noch keine einheitlichen Richtlinien zur Bestimmung der pulmonalen Leistungsfähigkeit bei EIA bei Eliteathleten. Auch bei Nicht-Athleten existiert kein universelles post-exercise Limit der Pulmonalfunktion zwischen EIA-positiven und EIA-negativen Individuen. Das cutt-off Kriterium für belastungsinduzierte Veränderungen ist eine 10-20%ige Reduktion der FEV₁. Es wurde jedoch nach mehr objektiven Kriterien gesucht, um diesen cutt-off Punkt zu beschreiben, so z.B. über Mittelwert plus doppelte Standardabweichung (Helenius, Tikkanen & Haahtela, 1998; Rundell et al., 2000). Setzt man diese Methode ein, so bedeutet eine Reduktion der FEV₁ um 6-7% als abnormal bei Eliteathleten (Helenius et al., 1998; Rundell et al., 2000).

Allein über einen Fragebogen, wie er beispielsweise von uns eingesetzt wurde, können kaum klinisch relevante Aussagen hinsichtlich eines EIA gemacht werden. Nach den Umweltbedingungen, die nachweislich zu belastungsinduzierten Asthmasymptomen, bei Nichtasthmatikern führen wurde im vorliegenden Fragebogen nicht gefragt. So kann es zum Beispiel sein, dass bei den meisten Probanden, die relevante Symptome angaben, diese vor allem unter erhöhter Pollen- oder Ozonbelastungen aufgetreten sind. Dies lässt sich jedoch nur spekulieren. Um die Ergebnisse des Fragebogens richtig zu interpretieren, wäre eine Messung der FEV₁ vor bzw. direkt im Anschluss an die Ausdauerbelastung sinnvoll gewesen.

5.3 Veränderungen der Zellkonzentrationen

Da der Hämatokrit bei den Untrainierten infolge der Belastung nicht signifikant verändert war, wurde aus diesem Grund auf eine Volumenkorrektur der Leukozyten und Leukozyten-Subpopulation verzichtet. Die Veränderung durch die Belastung lag unter 3%.

Es existieren zahlreiche Studien, in denen die Auswirkungen einer sportlichen Belastung auf die Parameter des Immunsystems untersucht wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen physischem Stress und Immunsystem eine gute Methode darstellt, um die Rolle des Stresses auf die immunophysiologischen Mechanismen zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass Adrenalin eine Leukozytose mit raschem Anstieg von Lymphozyten und Neutrophilen induziert. Nach heutigen Erkenntnissen kann man von einer β -Adrenozeptor vermittelten Leukozytose ausgehen (Gabriel, 2000). Bei langandauernden Belastungen kommt es zu einem ersten schnellen Anstieg von Leukozyten innerhalb der ersten 10 Minuten infolge der Adrenalin ausschüttung. Dabei erklärt sich ein Teil des Anstieges von NK-Zellen, Lymphozyten sowie Monozyten und Eosinophilen. Im weiteren Verlauf einer Belastung kommt es dann bei gleich bleibender Intensität zu keinem weiteren Anstieg der NK-Zellen und Lymphozyten (Tonnesen, Christensen & Brinklov, 1987). Gabriel (2000) konnte zeigen, dass bei einer einstündigen Ausdauerbelastung die Zellmobilisation für Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, Eosinophile und Basophile nach 30 min weitgehend abgeschlossen ist, auch wenn ein weiterer Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin zu verzeichnen war. Die während körperlicher Belastung erhöhte NK-Zellaktivität wird damit durch Adrenalin hervorgerufen (Kappel, Tvede et al., 1991). Bei der vorliegenden Untersuchung wurden die Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten bestimmt. Wie in vielen anderen Studien (z.B. Gabriel, 2000) konnte auch hier ein Anstieg der Lymphozyten durch die Belastung nachgewiesen werden. Der Anstieg der Lymphozytenkonzentration ist wahrscheinlich auf die Rekrutierung aller Lymphozytensubpopulationen des vaskulären Systems zurückzuführen (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Da die beiden Haupteinflussfaktoren des ersten raschen Leukozytenanstiegs nach Belastungsende schnell herab reguliert werden, kommt es innerhalb der ersten 30 Minuten nach Ende der Belastung zu einem raschen Leukozytenkonzentrationsabfalls (Gabriel, Urhausen & Kindermann, 1992). Der zweite Anstieg der Leukozyten erfolgt aufgrund des 2. Anstieges der Neutrophilen. Das im späteren Belastungsverlauf ansteigende Cortisol ist für diesen weiteren Anstieg der Neutrophilen verantwortlich (Weicker & Werle, 1991).

Bei den Monozyten kam es durch die Belastung zu einem leichten Anstieg und in den folgenden zwei Stunden danach wieder zu einem Absinken in etwa auf Ruhewerte. Der durch die Belastung induzierte Anstieg der Monozyten wird sowohl durch reguläre als auch reife Monozyten bedingt. Der Anstieg der Monozyten zeigt eine belastungsbedingte Abhängigkeit, denn es konnte nachgewiesen werden, dass Marathonläufe oder längere Ausdauerbelastungen zu einer stärkeren Monozytose führen, als kurze Belastungen (Gabriel & Kindermann, 1997; Weight, Alexander & Jacobs, 1991).

In der vorliegenden Studie konnte neben den bekannten Veränderungen ein signifikanter Unterschied der Gesamtleukozytenkonzentration in Abhängigkeit vom Trainingszustand nachgewiesen werden. Dies verhält sich kontrovers zu der in der Literatur aufgestellten These, dass ein Einfluss eines intensivierten Ausdauertrainings auf die Gesamtleukozytenkonzentration und alle anderen wichtigen Zelllinien ausgeschlossen werden kann (Gabriel, 2000). Allerdings zeigen Ausdauertrainierte eine höhere Aktivität des oxidativen Bursts von Monozyten und Neutrophilen als Untrainierte und auch die Expressionsdichte von wesentlichen Oberflächenmarkern ist unterschiedlich (Gabriel, 2000).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie belastungsinduzierte Reaktionen der Leukozytensubpopulationen vergleichbar zu Vorläuferstudien beobachtet werden konnten.

5.4 Belastungs- und trainingsinduzierte Veränderungen der Akuten-Phase-Proteine

Physiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass es nach muskulären Kontraktionen und sportlichen Belastungen zur Produktion von inflammatorischen Biomarkern im Blut kommt. So wurde festgestellt, dass es dabei zur Produktion von IL-6, einem inflammatorischen Protein und seinem biologischen Vorläufer CRP (C-reaktives Protein) kommt. Sie sind mit dafür verantwortlich die Glukose – Homöostase während einer körperlichen Belastung zu regulieren.

Akute Ausschüttungen von inflammatorischen Markern wurden vor allem nach intensiven Belastungen beobachtet, augenscheinlich als Folge von einer Inflammation der Muskulatur und der Gelenke, die durch eine hochbelastende physikalische Aktivität entsteht (King, Carek, Mainous & Pearson, 2003). Doch obwohl diese inflammatorischen Marker in den meisten Fällen unmittelbar nach der Belastung gemessen wurden, scheint es auch Anpassungseffekte dieser Marker auf moderate wiederkehrende Belastungen zu geben.

IL-6 (im Plasma): Ursprünglich wurde IL-6 als pro-inflammatorisches Zytokin bezeichnet, weil es in der frühen Phase einer Infektion zu einem starken Anstieg dieses Zytokins kommt. Inzwischen ist aber durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt wurden, dass IL-6 eher als anti-inflammatorisches Zytokin bezeichnet werden sollte (Tilg, Dinarello & Mier, 1997). Nach einem Marathonlauf steigt die IL-6 Konzentration im Plasma um das 100fache seiner Ruhewerte (Ostrowski, Rohde,

Asp, Schjerling & Pedersen, 1999), das entspricht Konzentrationen, die ansonsten bei Patienten mit schweren Infektionen vorliegen. Plasma IL-6 steigt während einer Belastung in Abhängigkeit von der Intensität und der Dauer der Belastung. Interleukin 6 wird dabei von verschiedenen Zellen und Geweben produziert. Die Hauptproduktionsquellen während einer Entzündung sind die stimulierten Monozyten und Makrophagen. Wie kürzliche Studien zeigten, sind diese Zellen jedoch nicht die Quelle für das IL-6, das während Belastung produziert wird (Starkie, R. L. et al., 2001), sondern die kontrahierende Muskulatur.

Frühere Studien zeigten, dass eine Belastung nicht zu einem Anstieg von IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und IL-6mRNA in mononukleären Zellen führen, obgleich die Plasmakonzentration von IL-1 β , TNF- α und IL-6 aufgrund der Belastung anstieg (Moldoveanu et al., 2000; Ullum, Haahr et al., 1994). Da Radfahren im Gegensatz zu Laufen eine wesentlich geringe exzentrische Komponente hat, steigt die Konzentration von IL-6 im Plasma, zwar signifikant, aber gegenüber Laufbelastungen (vgl. Starkie, R. L. et al., 2001 IL-6 = 120 pg/ml post-exercise) nur geringgradig an (5,46 pg/ml). Trotzdem kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-6mRNA Expression 45 min nach der Belastung. Von Ostrowski et al. (1998) wurde die Quelle der IL-6mRNA Produktion untersucht. Es wurde festgestellt, dass es bei einer Inflammation als erstes zum Anhaften der Neutrophilen und Monozyten an das vaskuläre Endothel des geschädigten Gewebes kommt. Es ist möglich, dass während dieses Anhaftens oder später während der Infiltration in das geschädigte Gewebe die Neutrophilen und Monozyten aktiviert werden und dadurch die lokale Quellen der IL-6mRNA werden (Ostrowski, Rohde, Zacho et al., 1998).

Die Akuten-Phase-Proteine werden des Weiteren in zwei Gruppen eingeteilt, basierend auf die Zytokine, die von ihnen reguliert werden. IL-6 reguliert direkt die mRNA Expression von type-II-APPs durch die Aktivierung von STAT3 herauf. Interleukin 6 trägt außerdem zu einem Anstieg der type-I-APP bei, welche hauptsächlich über IL-1 reguliert werden (Baumann & Gauldie, 1994).

Man untersuchte beispielsweise die *CRP-Konzentration im Plasma* bei verschiedenen Belastungsarten z.B. Laufen und Gewichtheben (Thomas, Cooney & Thomas, 2000). Bei dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Gewichtheber unmittelbar nach der Belastung eine Zunahme der CRP-Konzentration zeigten, wohingegen sie bei den Läufern unverändert geblieben ist. Im Weiteren

konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von CRP erst 2-5 Stunden nach der Belastung ansteigt und nicht unmittelbar danach. Ähnliches bestätigten auch Castell et al. (1997) die jedoch erst einen Anstieg der CRP-Konzentration 16h Stunden und Neidhart et al. (2000) sogar erst 24 und 48h nach einem Marathon nachweisen konnten. Diese unterschiedlichen Resultate könnten aufgrund der verschiedenen Untersuchungsgrößen und Belastungsintensitäten aufgetreten sein, sowie durch das häufige Fehlen von Kontrollgrößen, um Störfaktoren auszuschalten.

Die Erhöhung von CRP beruht auf einer Neusynthese, aufgrund dessen kann ein Konzentrationsanstieg erstmals 6-12 Stunden nach Beginn der Entzündungsreaktion gemessen werden. Der Konzentrationsanstieg von IL-6 dokumentiert den Beginn der Entzündungsreaktion und löst damit die Neusynthese des CRPs aus. Da in der vorliegenden Studie die letzte Messung bereits 2 Stunden nach Ende der Belastung erfolgte, konnte die deutliche Erhöhung des Plasmaspiegels von CRP nicht gezeigt werden, da diese erst nach 24 Stunden ihren Höhepunkt erreicht.

Des Weiteren konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine regelmäßige Ausübung sportlicher Betätigung, z.B. Fußball spielen, aufgrund von Adaptationsmechanismen zu einer reduzierten Produktion von inflammatorischen Markern (vor allem CRP) während der Belastung führt (Fallon, Fallon & Boston, 2001). Auch aus den vorliegenden Daten ist ersichtlich, dass die Ausdauertrainierten in allen Messzeitpunkten eine niedrigere CRP-Konzentration aufwiesen, als die Untrainierten. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Diese Beobachtung bestätigen auch Mattusch et al. (2000), die ebenfalls eine Reduktion der CRP-Konzentration bereits nach einem neunmonatigen Ausdauertraining nachweisen konnten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass insbesondere lange Ausdauerbelastungen zu geringgradigen Erhöhungen des CRP unmittelbar nach Belastung führen. Deutliche Erhöhungen lassen sich bei solcher Art von Belastung meist erst nach mehreren Stunden, oft erst nach einem Tag nachweisen. Kürzere konzentrische Ausdauerbelastungen führen hingegen nicht zu einer Erhöhung von CRP (Gabriel, 2000). Vermutlich unterliegt die Muskulatur dann nicht so ausgeprägten Reparaturprozessen, so dass diese eine erhöhte Produktion von APP induzieren. Trainingseinheiten mit überwiegend anaerobem intervallartigem Inhalt führen im Gegensatz zu einmaligen anaeroben Belastungen zu einer erhöhten Produktion von

CRP. Des Weiteren haben längerdauernde Belastungen, insbesondere mit exzentrischen Komponenten, im Gegensatz zu kurzdauernden aeroben Belastungen eine größere inflammatorische Potenz. Anhand der gemessenen inflammatorischen Parameter in der vorliegenden Studie ist damit erkennbar, dass die Intensität und Dauer der Belastung Reparaturprozesse provoziert – nachweislich über einen signifikanten Anstieg der APP. Um den weiteren Verlauf, insbesondere von CRP nachzuweisen, wäre jedoch eine weitere Messung 24h nach der Belastung notwendig gewesen.

5.5 Belastungsinduzierte Veränderungen der Genexpression asthmarelevanter Gene

Eine Reihe von Studien haben sich mit der Genexpression nach körperlicher Belastung auf muskelzellulärer Ebene beschäftigt (Cameron-Smith, 2002; Goldspink, 2003; Kim, Y. B., Inoue et al., 1999; MacLean, Zheng & Dohm, 2000; Nordsborg, Bangsbo & Pilegaard, 2003; Pilegaard, Ordway, Saltin & Neufer, 2000; Tunstall, Mehan et al., 2002; Zambon, McDearmon et al., 2003). In deutlich weniger Studien wurde dagegen die Genexpression in Blutzellen nach körperlicher Belastung untersucht (Connolly, Caiozzo et al., 2004; Fehrenbach, Niess et al., 2000; Moldoveanu et al., 2000; Whitney, Diehn et al., 2003). Connolly et al. (2004) untersuchten den Effekt einer 30minütigen Dauerbelastung mit 80% der maximalen Sauerstoffaufnahme auf die Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen. Zu diesen Zellen zählen Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen, neutrophile Granulozyten wurden in der Studie mit Hilfe einer Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation entfernt. In die Studie eingeschlossen wurden junge Probanden zwischen 18 und 30 Jahren mit einer maximalen Sauerstoffaufnahme von 35-45 ml/kg/min, vergleichbar zu der untrainierten Probandengruppe in der vorliegenden Studie. Connolly et al. (2004) konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Vielzahl von stressspezifischen (z.B. Heat Shock Proteinen) bzw. inflammatorischen Mediatoren (z.B. spezifische Interleukinrezeptoren wie IL-1R, IL-1R2 etc. und Chemokine wie CCL3-5), sowie auch Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren (TCF8) vor und nach dem körperlichen Stresstest unterschiedlich reguliert wurden. Diese Effekte sind zu Beginn pro-inflammatorisch zu werten, sind aber nur von kurzer Dauer. Anti-inflammatorische Reaktionen folgen dem inflammatorischen Reiz mit einer

Hochregulation von z.B. von IL-1ra, HSP and DUSP, die in der Lage sind MAPK bzw. den stress-aktivierten Protein-Kinase-Pathway zu deaktivieren (Connolly et al., 2004). Einige HSP's sind in der Lage auch NF- κ B zu inhibieren, dies erklärt z.B. den kardioprotektiven Effekt von HSP70, welcher in verschiedenen Studien (Joyeux, Godin-Ribuot, Yellon, Demenge & Ribuot, 1999; Powers, Lennon, Quindry & Mehta, 2002) nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Studie untersuchte Veränderungen der Genexpression in peripheren Blutzellen in acht gut trainierten männlichen Ausdauersportlern, die unter Wettkampfbedingungen einen Halbmarathon absolvierten (Zieker, Zieker et al., 2005). Die mittlere Belastungsdauer lag dabei bei 105 ± 21 min. Dabei wurden 1152 cDNAs untersucht. 36 Gene waren beim Vergleich prä vs. post verändert, 21 Gene beim Vergleich prä vs. 24 Stunden post. Auch hier zeigten sich wieder eine Reihe pro-inflammatorischer Gene verändert, es wurden allerdings nur wenige asthmarelevante Gene wie MAPKAP K2 als Marker der Signaltransduktion und PTGS1, TBXAS1 bzw. IL-1R2 als Marker für die Inflammation untersucht. PTGS1 und TBXAS1 waren im Vergleich zur vorliegenden Studie nicht verändert. Nur vereinzelte Studien haben sich bisher gezielt mit belastungsinduzierten Veränderungen asthmarelevanter Gene beschäftigt (Dixon, Diehl et al., 1990; Hashimoto, Matsumoto et al., 1999; Popescu, 2003; Silverman, E., In, Yandava & Drazen, 1998; Steinhilber, 1994). In einer Vorläuferstudie wurden 6 gesunde Probanden hinsichtlich ihrer Genexpression nach einer 90minütigen Belastung mit 90% der IAS zu den Zeitpunkten vor, bzw. 2 und 6 Stunden nach Belastung untersucht (Hilberg et al., 2005). Erstmals wurde hierbei der Leukotrienstoffwechsel näher beleuchtet. Dabei zeigte sich das die mRNA des ALOX5-Gens nach Belastung deutlich hochreguliert war und dies einherging mit einer Hochregulation des aktivierenden Proteins (ALOX5AP), dem so genannten FLAP. Dies war der erste klare Hinweis, dass es auf Genregulationsebene zu Veränderungen im Leukotrienstoffwechsel kommt. Eine Zunahme auf Produktebene der Leukotriene nach Belastung konnte in dieser Studie vergleichbar zu den Ergebnissen anderer Studien, wie z.B. von Caillaud et al. (2003) und Rundell & Jenkinson, (2002) entsprechend nachgewiesen werden.

Eikosanoidstoffwechsel:

Die Leukotriene stellen zentrale Mediatoren im asthmatischen Geschehen da. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Gabe eines

Leukotrienrezeptorantagonisten, wie z.B. Montelukast, sehr wohl die Symptomatik des EIA reduzieren kann (Aharony, 1998; Edelman, Turpin et al., 2000; Grieco & Burstein-Stein, 2000; Leff, Busse et al., 1998; Mastalerz, Gawlewicz-Mroczka, Nizankowska, Cmiel & Szczeklik, 2002; Peroni, Piacentini et al., 2002; Villaran, O'Neill et al., 1999). Die CysLTs - hierzu zählen LTC₄, LTD₄ und LTE₄ - sind die Schlüsselmediatoren und Modulatoren der systemischen allergischen Antwort und sind wichtige Komponenten der inflammatorischen Reaktion, die zu den typischen Symptomen des Asthmas, wie Bronchokonstriktion und erhöhte Mukussekretion führen (Busse, W. & Kraft, 2005). LTC₄, D₄ und E₄ haben sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* eine sehr hohe Aktivität als Bronchokonstriktoren. Sulfidopeptide haben auf molarer Basis eine 1.000fach höhere bronchokonstriktorische Wirkung in der menschlichen Atemwegsmuskulatur als Histamine (Henderson, 1994a). Sie werden von Eosinophilen, Basophilen, Makrophagen und Mastzellen und zu einem geringeren Maß auch von T-Zellen und Endothelzellen gebildet (Busse, W. & Kraft, 2005). CysLTs sind der Grund für eine Vasodilatation und erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität, was zu Gewebsödemen und einem verlängerten Überleben von Eosinophilen führt. Erhöhte CysLT-Level konnten vor allem im Urin und Sputum von Asthmatikern nachgewiesen werden (Hallstrand, Moody, Aitken & Henderson, 2005). Der primäre biologische Effekt von LTB₄ ist es, die Chemotaxis der Leukozyten zu unterstützen. LTB₄ hat aber noch andere wichtige Effekte auf die Leukozyten. So löst es die Ansammlung von Leukozyten aus und ist zuständig für deren Anhaften am vaskulären Endothel. Leukotrien B₄ führt des Weiteren zu einer Hochregulation von CD11b/CD18 Proteinen und zur Ausschüttung von L-Selektin an Neutrophilen.

EIA geht mit einer Hyperosmolarität des Gewebes und damit einer Verengung der Atemwege einher (Anderson & Daviskas, 2000). Diese Hyperosmolarität führt zu osmotischem Stress und möglicherweise zur Aktivierung von 5-LO und der LT-Biosynthese über den p38MAPK Pathway. Andere Umstände, bei denen es zu einer Aktivierung von p38MAPK kommt und bei der die LT einbezogen sind, sind die ischämische Reperfusions-Erkrankung und ARDS (adult respiratory distress syndrome) und wie in dieser Studie nachgewiesen auch entsprechende körperliche Belastungen.

Bei der Zellstimulierung kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und dies stellt auch einen bedeutenden Aktivierungsschritt für die LT Biosynthese darstellt. Die Phospholipase A₂ befindet sich in ruhenden Zellen

im Zytosol und nach einer kalziumabhängigen Aktivierung der Zellen kommt es zu einer Translokation von cPLA₂ zur Kernhülle. Trotz der verschiedenen Isotypen von PLA₂s, spielt das 85 kDA cPLA₂ eine entscheidende Rolle in der Freisetzung von Arachidonsäure für die LT Synthese in Leukozyten, abhängig vom Zelltyp und dem Stimulus (Leslie, 1997). Einige Studien bestätigten auch die Beteiligung von cPLA₂ bei der Bildung von LT aus Neutrophilen und Makrophagen. Es ist zusätzlich nachgewiesen, dass es nach einer Zellaktivierung zu einer kalziumabhängigen Translokation nicht nur cPLA₂, sondern auch von 5-LO zur Kernhülle kommt (Pande, Moc et al., 2004; Peters-Golden, 1998; Woods et al., 1993). Kalzium stimuliert die 5-LO Enzymaktivität und Membranassoziation (Hammarberg & Radmark, 1999). Die katalytische Aktivität von 5-LO wird außerdem über ATP und zu einem geringeren Anteil über andere Nukleotide stimuliert.

Die Lokalisierung von 5-LO in ruhenden Zellen differiert je nach Zelltyp. In Neutrophilen und Monozyten des peripheren Bluts kommt 5-LO vorwiegend im Zytoplasma vor, während in ruhenden alveolaren Makrophagen das Enzym teilweise oder auch überwiegend im löslichen Kompartiment des Zellkerns vorkommt (Hanaka et al., 2005; Werz, 2002). Jedoch egal, ob sich das Enzym in ruhenden Zellen im Zytosol oder im Nukleus befindet, nach Zellaktivierung kommt es immer zu einer Verschiebung zur Kernhülle (Brock et al., 1995; Peters-Golden, 1998; Woods et al., 1993). Beobachtungen ergaben, dass 5-LO eine Ca²⁺ - Bindungsdomäne, ähnlich zu der C2 Domäne der Protein Kinase C und der cPLA₂ besitzt (Hammarberg & Radmark, 1999). Diese Domäne sitzt am N-terminus des Enzyms und ist notwendig für die Translokation von 5-LO zur Kernhülle.

Der Mechanismus der Membranbindung von 5-LO ist allerdings zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Pande et al., 2004). Die Lokalisation von 5-LO an der Kernmembran scheint entweder von spezifischen Interaktionen zwischen 5-LO und den Proteinen oder Lipiden des Zellkerns oder non-spezifischen Faktoren, wie der Membranoberflächenladung oder der abgesonderten Lipidzusammensetzung der Kernmembran beeinflusst zu sein (Pande et al., 2004). Außerdem scheint die Zusammensetzung der Phospholipide in der Zellmembran eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von 5-LO zu spielen. So konnte nachgewiesen werden, dass Phosphatidylcholine (PC) eine stärkere Bindung von 5-LO mit seiner C2-artigen Domäne an die Kernmembran zur Folge hat, als Membranen, die überwiegend säurehaltige Lipide (wie Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylglycerol (PG))

enthalten. Kalzium stimuliert *in vitro* in starkem Maße die 5-LO Reaktionen, es erhöht die Hydrophobie von 5-LO und ist vor allem der Grund für die Bindung von 5-LO an phosphatidylcholine Vesikel (Noguchi, Miyano, Matsumoto & Noma, 1994). Die hohe Affinität von 5-LO an PC begründet die selektive Translokation an PC-reiche Kernmembranen (Pande, Qin & Tatulian, 2005). Pande et al. (2005) zeigten, dass außerdem die Beschaffenheit der Membranfluidität ein wichtiger Faktor der Membranbindungsstärke von 5-LO und die Aktivität der Enzyme ist. Hohe Anteile von arachidonhaltigen Lipiden in der Kernmembran resultieren in einer erhöhten Fluidität der Membran (Pande et al., 2005). Das führt zu der Annahme, dass eine gesteigerte Membranfluidität infolge eines hohen Anteils von arachidonhaltigen Lipiden einen wichtigen Faktor bei der Translokation von 5-LO zur Kernmembran und dem Einsatz der Cyclooxygenasen darstellt, die wiederum eine entscheidende regulatorische Rolle in der Biosynthese der Prostanoiden und Leukotriene haben (Pande et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte zunächst eine verstärkte Expression der ALOX5 mRNA nachgewiesen werden. Damit führt die körperliche Ausdauerbelastung höchstwahrscheinlich zu einer Induktion der Bildung von 5-LO. Zusätzlich hierzu wurde in der vorliegenden Studie auch eine Expressionszunahme der ALOX5AP mRNA nachgewiesen, die die Bildung von FLAP induziert. Die Expression von FLAP geht einher mit Bildung von 5-LO-Proteinen in myeloischen Zellen wie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten und die Aufregulation von FLAP wird begleitet von der Aufregulation von 5-LO (Werz, 2002). Nach Gabe von GM-CSF konnte im Zellversuch bei PMNL und in Monozyten eine Zunahme der Expression beider Proteine nachgewiesen werden (Pouliot, McDonald, Borgeat & McColl, 1994). In der vorliegenden Studie war GM-CSF nach Belastung signifikant hochreguliert. Die Notwendigkeit von FLAP bei der zellulären Leukotriensynthese konnte in einem Transfektionsmodell mit Hilfe einer Osteosarkom-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Co-Transfektion mit Beiden, 5-LO und FLAP, führte zur Leukotriensynthese nach Stimulation mit Ionophoren. Die Zelltransfektion mit 5-LO alleine führte zu keiner Leukotrienbildung (Werz, 2002). Als zusätzlicher Beleg für die Bedeutung von FLAP bei der Leukotriensynthese dienen Experimente mit FLAP-knock-out Mäusen. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in FLAP-knock-out Mäusen zu keiner Leukotrienbildung in der Lage sind (Byrum, Goulet, Griffiths & Koller, 1997). Damit wird die Bedeutung der erhöhten ALOX5AP Expression in diesem Belastungsexperiment unterstrichen. Aber nicht nur die Expression von ALOX5 und

ALOX5AP waren in dem Belastungsexperiment verändert, sondern es konnten auch Belege für Mechanismen aufgedeckt werden, die zu einer stärkeren Aktivierung der 5-LO führen.

Verschiedene Trigger wie Zellstress, UV-Licht, osmotischer Schock aber auch inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-1, TNF bzw. PAF und fMLP führen zu einer Aktivierung von p38MAPK teilweise *in vivo* bzw. *in vitro*. Die durchgeführte körperliche Belastung in der vorliegenden Studie führte nachweislich auch zu einer erhöhten p38MAPK Expression sowohl bei den trainierten als auch bei den untrainierten Probanden. P38MAPK existiert in verschiedenen Isoformen (Radmark, O. & Samuelsson, 2005). Eine aktivierte p38MAPK kann MAPKAP Kinasen 2 und 3 phosphorylieren und damit aktivieren. 5-LO konnte als Substrat für MK2/3 nachgewiesen werden, dabei wird 5-LO im *in vitro* Vergleich zu HSP27 aber nur schwach phosphoryliert. Allerdings führt die Zugabe von ungesättigten Fettsäuren (u.a. UFA, AA) zu einer gesteigerten Phosphorylierung von 5-LO durch MK2. Aktivierte Phosphorylierungsprozesse durch p38MAPK können nicht nur die 5-LO aktivieren. Auch eine Beteiligung von p38MAPK an der Translokation von 5-LO konnte nachgewiesen werden (Werz et al., 2000).

Abschließend sind auch Polymorphismen bedeutsam für die Leukotrienregulation und dabei vermutlich auch bei der Symptomatik des Asthmas. Untersuchungen der DNA von Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern zeigten das Vorhandensein von Mutationen innerhalb der funktionellen Promoterregion des 5-LO (Silverman, E. S. & Drazen, 2000).

Zytokine und Chemokine

Körperliche Aktivität oder sportliche Belastung induzieren im Körper eine inflammatorische Antwort, die zuerst zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , und IL-6) und in einer weiteren Regulation von anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B.: IL-4, IL-10 und IL-1ra) führt (Pedersen et al., 1998). Die Produktion der Zytokine wird rapide durch inflammatorische Stimuli heraufreguliert. Die Reaktivität der Zytokine ist dabei in hohem Maße von der Art und Intensität der Belastung, der Kohlenhydratgabe (Nieman, Davis et al., 2004) und der Körperkerntemperatur abhängig. Die Höhe des durch körperliche Aktivität induzierten Anstiegs des Serumzytokinlevels ist individuell schlecht vorhersagbar. Bruunsgaard et al. (1997) fanden mRNA für IL-6 in der arbeitenden Muskulatur, jedoch nicht im Blut. Moldoveanu et al. (2000) fanden des Weiteren keine Veränderungen von

mRNA-Levels für IL-1 β , IL-6 und TNF- α in den zirkulierenden Zellen nach einer moderaten 3-stündigen Ausdauerbelastung.

Interleukin-1 ist ein Polypeptidprodukt unterschiedlicher Zellen, dass verschiedene Komponenten der Akuten Phase Reaktion nach Verletzungen und Infektionen vermittelt (Dinarello, 1988b). IL-1 ist mitunter das erste Zytokin, welches als Antwort auf eine Belastung freigesetzt wird. Seine wichtigste Eigenschaft, im Bezug auf Asthma, ist die Fähigkeit Arachidonsäure Metaboliten in unterschiedlichen Zellarten, wie PGE in Fibroblasten und Synovialzellen zu induzieren. Außerdem induziert es die Bildung von Produkten der Lipooxygenase in Lymphozyten und anderen Zellen (Dinarello, 1988b). IL-1 beeinflusst außerdem die Prostaglandin und Lymphozyten-Aktivität, ebenso wie viele andere biologische Aktivitäten (Dinarello, 1988b).

Die Plasmakonzentration von IL-1 ist zum Teil schwierig zu bestimmen, da das Grundlevel des zirkulierenden IL-1 unter der sensitiven Schwelle des technisch messbaren bleibt. Beispielsweise konnte in einer Untersuchung von Ullum et al. (1994) an Untrainierten nach einer einstündigen Ergometerbelastung bei 75% der VO₂max festgestellt werden, dass die Werte von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α nach der Belastung unter dem messbaren Limit lagen und dass außerdem die mRNAs der Zytokine sich durch die Belastung nicht verändert hatten.

Northoff et al. (1991) allerdings fanden einen schwachen Anstieg von IL-1 nach einer Belastung und auch Moldoveanu et al. (2000) fanden bei einer 3-stündigen Belastung bei 60-65% ein signifikantes Ansteigen von IL-1 β , IL-6 und TNF- α nach 60 Minuten. Dieser Anstieg hielt bis zur 180. Minute weiter an und die Konzentration war 24 Stunden nach der Belastung immer noch erhöht. Allerdings zeigte die in der gleichen Studie gemessene mRNA Genexpression der Zytokine in mononukleären Zellen keine Effekte durch die Belastung. Auch in anderen Studien konnte z.B. IL-1 β nach unterschiedlichen Ausdauerbelastungen (z.B. Marathonlauf (Suzuki, Yamada et al., 2000)), erhöht nachgewiesen werden.

Die Höhe des IL-1 Anstiegs im Plasma ist abhängig von der Art, der Intensität und von der Dauer der Belastung. Belastungen induzieren weiter einen 2 - 214fachen Anstieg der zirkulierenden IL-1ra (Rezeptorantagonist)-Konzentration. Ostrowski et al. (1998) zeigten, dass eine 2,5stündige Belastung bei 75% der VO₂max einen Anstieg des zirkulierenden IL-1ra um das 78fache zwei Stunden nach der Belastung zur Folge hatte. In der vorliegenden Studie konnte eine belastungsinduzierte Zunahme des IL-1-Rezeptor 1 und 2 in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Ob

über die Zunahme des Rezeptors die Wirkung von IL-1 verstärkt wird bleibt unklar, IL-1 selber zeigte keine belastungsinduzierten Expressionsveränderungen.

Tumor Nekrose Faktor und GM-CSF sind wichtige Zytokine für die Ausreifung von dendritischen Zellen. Frühere Studien zeigten, dass TNF- α zu einer Expression von 5-LO (Steinhilber, 1994) und FLAP beiträgt (Reddy, Serio, Hodulik & Bigby, 2003). Damit nimmt TNF- α ebenso eine wichtige Rolle bei der Regulation im Eikosanoidstoffwechsel und damit beim Asthma ein.

Viele Untersuchungen konnten eine Freisetzung von TNF- α ins Plasma nach lang andauernden Ausdauerbelastungen nachweisen. So zeigte Rokitzki et al. (1994) einen Anstieg des TNF- α -Levels im Plasma in Folge eines Marathonlaufes. Dufaux & Order (1989) verfolgten die Kinetik des TNF- α im Plasma und konnten dort eine maximale Konzentration 60 Minuten nach einem 2,5stündigen Lauf beobachten. 120 Minuten nach Ende der Belastung war die Konzentration jedoch schon wieder unter das Ausgangsniveau abgefallen. Vergleichbar zu diesen Ergebnissen zeigten Ostrowski et al. (1998) ein 2,5faches Ansteigen des Plasma-TNF- α -Levels unmittelbar nach einer 2,5stündigen Laufbandbelastung bei moderater bis hoher Intensität. Brenner et al. (1998; 1999) fanden einen Anstieg von TNF- α , als Antwort auf eine zweistündige Ergometerbelastung bei 60% der VO_{2max} , mit Höchstwerten 72 Stunden nach der Belastung. Ebenso beobachteten Moldoveanu et al. (2000) ein 90%iges Ansteigen des Plasma-TNF- α im Anschluss an eine dreistündige Ausdauerbelastung (60-65% der VO_{2max}), welches über die folgenden 24 Stunden sich allmählich wieder reduzierte. Jedoch konnten keine signifikanten Veränderungen bei einer fünfminütigen Belastung bei 90% der VO_{2max} oder durch ein erschöpfendes Zirkeltraining nachgewiesen werden.

Ullum et al. (1994) konnten keine Veränderungen der isolierten TNF- α pre-mRNA - aus Monozyten des Peripherblutes - nach körperlicher Aktivität nachweisen. Ebenso sahen Moldoveanu et al. (2000) kein Ansteigen der TNF- α mRNA in mononukleären-Zellen und Natelson et al. (1996) demonstrierten dass eine 45minütige progressive erschöpfende Laufbandbelastung die TNF- α -Genexpression direkt nach einer Belastung abschwächt. Durch die Reverse-Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion konnte nachgewiesen werden, dass von den pro-inflammatorischen Zytokinen lediglich die TNF- α -Genexpression durch Belastungen beeinflusst wird. Auch in der vorliegenden Studie konnte ein belastungsinduzierter Anstieg der TNF- α -Genexpression in beiden Gruppen nachgewiesen werden. IL-1 und die TNF- α -

Genexpression haben Auswirkungen auf die 5-LO-Aktivität und damit einen direkten Bezug zum asthmatischen Geschehen. So zeigten Spanbroek et al. (2000) dass GM-CSF und TNF- α die Differenzierung der dendritischen Zellen fördern und zu einem starken Anstieg der Expression von 5-LO und FLAP führen. Diese Beobachtungen werden von der Arbeitsgruppe um Reddy et al. bestätigt (Reddy et al., 2003). Ein weiterer Zusammenhang zum Eikosanoidstoffwechsel besteht in der Tatsache, dass LTB₄ die Freisetzung von IL-1 und TNF- α aus Monozyten stimuliert (Dubois, Bissonette & Rola-Pleszczynski M., 1989).

IL-8 zählt des Weiteren zu den stark inflammatorischen Zytokinen. *IL-8* spielt eine Rolle bei der Pathogenese von allergischen Entzündungen, wie beim Asthma bronchiale. Es wird von Epithelzellen exprimiert (Hashimoto et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hyperosmolarität zu einer *IL-8* Protein Produktion bei gleichzeitiger Aufregulation der *IL-8* mRNA Expression führt (Hashimoto et al., 1999). Damit konnte möglicherweise belegt werden, dass eine Hyperosmolarität per se ein Schlüsselfaktor für die Expression von *IL-8* ist und dieser Weg über den p38MAPK abhängigen Pathway vermittelt wird (Hashimoto et al., 1999). Obwohl es sich bei der vorliegenden Studie um gesunde Probanden handelte und es wahrscheinlich nicht zu einer Hyperosmolarität innerhalb der Atemwege kam, regulierte *IL-8* infolge der Belastung trotzdem hoch. Hier ist der Aktivierungsweg aber höchstwahrscheinlich über die direkte Aktivierung des p38MAPK – Pathways zu erklären. Meyer et al. (2001) zeigten, dass eine kurzzeitige anaerobe Belastung bei Untrainierten ($VO_{2max}/kg = 52 \text{ ml/kg/min}$) keine Veränderung der Konzentration von *IL-8* induzierte. Untersuchungen der *IL-8* Konzentration nach Ausdauerbelastungen (1h bei 75% der VO_{2max}) zeigte bei Ausdauertrainierten ($VO_{2max}/kg = 66,3 \text{ ml/kg/min}$) auch keine Veränderung gegenüber den Ruhewerten (Niess, Fehrenbach et al., 2003). Erst langandauernde intensive Ausdauerbelastungen (z.B. Halbmarathon oder Marathon) führen teilweise zu einem starken Anstieg der *IL-8* Konzentration im Plasma (Niess, Passek et al., 1999; Pedersen et al., 2001; Suzuki et al., 2000) und *IL-8* mRNA Expression im Muskel (Nieman, Davis et al., 2003).

IL-8 zeigt des Weiteren eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, inklusive der chemotaktischen Aktivität von Neutrophile und T-Lymphozyten. Außerdem ist es für die chemotaktische Aktivität der Eosinophilen verantwortlich und führt zur Ausschüttung von Histaminen aus Basophilen (Bischoff, Kriger et al., 1993; Collins, Weg et al., 1993; Sehmi, Cromwell, Wardlaw, Moqbel & Kay, 1993). Weiterhin führt

LTB₄ zu einer erhöhten Proliferation von T-Zellen und stimuliert die Freisetzung von IL-8 aus polymorphnukleären Leukozyten (McCain, Holden, Blackwell & Christman, 1994).

IL -10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches von TH₂ Zellen gebildet wird und der Entwicklung von TH₁ –Zellen entgegenwirkt, indem es die Produktion von IL-12 und IFN- γ unterdrückt (Wynn, 2003). Brenner et al. (1999) konnten bei Untrainierten ($\text{VO}_2\text{max} = 42 \text{ ml/kg/min}$) infolge eines Zirkeltrainings oder einer 2stündigen Fahrradergometrie bei 60% der VO_2max keine Veränderung der IL-10 Konzentration im Plasma nachweisen. Allerdings konnte bei einer fünfminütigen intensiven Belastung bei 90% der VO_2max eine Abnahme der Plasmakonzentration drei, 24 und 72 Stunden nach der Belastung beobachtet werden. Genexpressionsanalysen zeigten außerdem, dass die IL-10 mRNA Konzentrationen in Leukozyten nach einer maximalen Laufbandbelastung unverändert waren. Auch in der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-10 mRNA keine Abhängigkeit von der Belastung zeigte. Das legt den Schluss nahe, dass die Veränderung des zirkulierenden IL-10 eine akute Freisetzung darstellt und nicht im Zusammenhang mit der Genexpression steht. Aus experimentellen Asthma-Modellen kann angenommen werden, dass IL-10, eher eine gegen-regulatorische Typ 1 Zytokinantwort vermittelt, wodurch allergisch inflammatorische Prozesse in der Lunge gehemmt werden (Wynn, 2003). Das bestätigt auch die Beobachtung, wonach nur wenige TH₁-Effektorzellen in der Lunge von Gesunden nachgewiesen werden konnten, wohin gegen Asthmatiker eine höhere Konzentration an TH₁-Effektorzellen aufwiesen, verbunden mit einer verringerten IL-10 Konzentration (Umetsu & DeKruyff, 1999). In der vorliegenden Studie kam es lediglich zu einer Abnahme der IL-10-Rezeptor Genexpression. Die Bedeutung dieser Veränderung bleibt wie auch die Downregulation des IL-2 Rezeptor zunächst im Unklaren.

Zytokine und andere Komponenten können ebenso den 5-LO Pathway beeinflussen und die Expression von 5-LO und FLAP kann durch diese spezifischen Moleküle kontrolliert werden (Hedi & Norbert, 2004). So wurde zum Beispiel festgestellt, dass die von den TH₂-Zellen gebildeten Zytokine IL-4 und IL-13 die Freisetzung von Leukotrienen aus Monozyten durch Reduktion an FLAP mRNA und Proteinkonzentration hemmen, wohingegen IL-1 und IFN- γ (TH₁ – Zytokine) die 5-LO Expression stimulieren (Nassar, Montero, Fukunaga & Badr, 1997).

Interleukin 4 und 13 sind zwei Zytokine, die von TH₂-Zellen, Mastzellen und Basophilen produziert werden. Neben ihrer physiologischen Rolle sind sie in die pathologischen Zustände von Allergien, wie Asthma involviert. Interleukin 4 ist aktiver bei der Regulation der TH₂-Entwicklung, während IL-13 aktiver bei der Regulation der Atemwegs – Hypersensitivität und Mukus – Hypersekretion ist (Kelly-Welch, Hanson, Boothby & Keegan, 2001). Die Effekte von IL-13 werden über eine Bindung an einen heteromeren Rezeptor, der aus IL-4R α und entweder IL-13R α 1 oder IL-13R α 2 besteht, vermittelt (Chavez, Young, Corry & Lieberman, 2006). Die enge Beziehung von IL-13 und den Leukotrienen wurde in einer Untersuchung von Chavez et al. (2006) nachgewiesen. Dort konnte gezeigt werden, dass das LTC₄ die Möglichkeit besitzt einen Anstieg der IL-13R α 1 Subunit RNA, unabhängig von STAT6 zu erzielen. STAT6 ist ein Transkriptionsfaktor, über dessen Aktivierung IL-13 die Signale vermittelt. Der IL-13 und STAT6 Pathway gehört zu den wichtigsten und zentralen Mediatoren allergischer Erkrankungen. STAT6 spielt die zentrale Rolle bei der Genregulation der IL-4- und IL-13-regulierenden allergischen Antwort, inklusive der TH₂-Differenzierung, IgE-Produktion und Chemokin- und Mukusproduktion bei allergischen Entzündungen (Kelly-Welch et al., 2001). Des Weiteren konnte noch gezeigt werden, dass IL-13 die Leukotrien- und Leukotrien-Rezeptor RNA-Konzentrationen beeinflussen kann. Allerdings konnte die Richtung der Regulation im Tiermodell noch nicht eindeutig geklärt werden (Chavez et al., 2006; Vargaftig & Singer, 2003), da Interaktionen zwischen dem LT- und IL-13 Stoffwechsel sehr komplex sind und weiterer Untersuchungen bedürfen.

IL-4 in Verbindung mit IL-13 geben das Signal für den Switch von IgM zu IgE Antikörpern (Fireman, 2003). Diese Kreuzverbindung von zwei IgE-Molekülen bei Allergenen ist der Grund für die Degranulation von Mastzellen, die Freisetzung von Histaminen, Leukotrienen und anderen Mediatoren die zu einer Entzündung der Atemwege führen (Fireman, 2003). Bei verschiedenen Untersuchungen nach körperlicher Belastung konnte jeweils nachgewiesen werden, dass es keine Veränderung, weder in der Plasmakonzentration von IL-4 (Suzuki, Nakaji et al., 2002) nach einem Marathon, noch in der Genexpression nach einem maximalen Laufbandtest (Natelson et al., 1996) gab. Das unterstützt die Genexpressionsdaten von IL-4 in der vorliegenden Studie, in der sich die IL-4 Expression durch die körperliche Belastung ebenfalls unverändert darstellte.

Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die in T-Zellen gebildeten Lymphokine, wie IL-5 zusammen mit GM-CSF zu einer Eosinophilie und im weiteren Verlauf zu chronischem Asthma führen können (Kay, 1988). Zur Hauptaufgabe von IL-5 gehört die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen. Mikroskopisch wird Asthma in erster Linie über die Präsenz einer gesteigerten Anzahl von Eosinophilen, Neutrophilen, Lymphozyten und Plasmazellen im Bronchialgewebe, Bronchialsekretion und Mukussekretion charakterisiert (Fireman, 2003).

RANTES: Die zelluläre Quelle von RANTES (CCL5) ist noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Aus früheren Arbeiten kann jedoch angenommen werden, dass wahrscheinlich die CD8⁺ T-Zellen für die Expression des Chemokins in Frage kommen (Bisset & Schmid-Grendelmeier, 2005). Die Hauptaufgabe von CCL5 scheint jedoch in der Regulation der Funktion der Eosinophilen zu liegen (Bisset & Schmid-Grendelmeier, 2005). Außerdem besteht ein enger Bezug zwischen dem MAPK-Pathway, Hyperosmolarität und der Produktion von IL-8 und RANTES. Interleukin-8 ist für die chemotaktische Aktivität von Neutrophilen und Eosinophilen verantwortlich (Baggiolini, Dewald & Moser, 1994; Collins et al., 1993; Sehmi et al., 1993) und RANTES für die chemotaktische Aktivität der Eosinophilen (Baggiolini & Dahinden, 1994). Furuichi et al. (2002) zeigten, dass IL-8 und RANTES als Antwort auf einen hyperosmolaren Stimulus in bronchialen Epithelzellen produziert werden. Als solches sind IL-8 und RANTES in die Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen in die Atemwege während der Spätphase bei einer belastungsinduzierten Bronchokonstriktion involviert (Furuichi et al., 2002). Untersuchungen der intrazellulären Pathways, die für die Regulierung der Hyperosmolarität verantwortlich sind zeigten, dass p38MAPK die daraus induzierte IL-8 und RANTES Produktion in Epithelzellen reguliert (Furuichi et al., 2002).

Weitere Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Wichtigkeit der Chemokine bei der Entwicklung und Erhaltung von allergischen Asthma ist einmal die direkte Rolle bei der Erzeugung der lokalen Eosinophilen Akkumulation und zweitens die Möglichkeit lokale Ereignisse zu beeinflussen, die zu einer TH₂-Zellen Dominanz führen (Sallusto, Lanzavecchia & Mackay, 1998). Aktivierung und Degranulation von Eosinophilen in den Atemwegen von Asthmatikern führt typischerweise zu einem vielfältigen Freiwerden von gewebschädigenden Produkten, die in der Lage sind die Umstände der Krankheit zu

verschlimmern (Cohn, Elias & Chupp, 2003). Allergene lösen eine Rekrutierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Lunge aus. Insbesondere die Sekretion von TH₂-Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-13 aus CD4⁺ T-Zellen resultieren in einer erhöhten lokalen Produktion von Chemokinen, wie CCL1, CCL11 (Eotaxin-1), CCL13 (MCP-4), CCL17 (TARC) und CCL22 (MDC) (John & Lukacs, 2003). Es konnte beschrieben werden, dass in der frühen Phase des allergischen Asthmas überwiegend CCR3 eingesetzt wird, während bei wiederholten allergischen Reizen der CCR4-Pathway favorisiert wird. Nach Fulkerson et al. (2004) konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine enge Beziehung zwischen allergischen Atemwegsentzündungen und erhöhten Werten von CXCL9 (Mig) und CXCL10 (IP-10) bestehen. Beide Chemokine binden an CXCR3. Die Autoren konnten in *in vivo* Experimenten des Weiteren demonstrieren, dass es durch eine Störung von CCR3 und CXCL9 eine Hemmung der Eosinophilen zur Folge hat. Die Identifikation von CXCL9 als ein Schlüsselenzym beim allergischen Asthma, unterstützt das Konzept, dass die Co-Entwicklung von TH₁ und TH₂ während dem allergischem Asthma zu einem unterschätzten Merkmal dieser Krankheit gehört (Bisset & Schmid-Grendelmeier, 2005). In der vorliegenden Studie konnte jedoch nur gezeigt werden, dass es belastungsbedingt zu einer Abregulation der Expression von CXCL9 unabhängig vom Trainingszustand kam.

Die Produktion der TH₂ Chemokine CCL17 und CCL22 ist der Grund für die lokale TH₂-Zelldominanz während des allergischen Asthmas. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin D₂ einen starken indirekten Einfluss auf die CD4⁺ T-Zellen und die Eosinophilen Rekrutierung hat, indem es bronchiale Epithelzellen zur Produktion von CCL22 stimuliert (Honda, Arima et al., 2003). Im Gegensatz zum Einfluss auf CCL22 konnte kein Effekt von PGD₂ auf CCL17 nachgewiesen werden. Ein belastungsinduzierter Effekt auf die Expression der beiden Chemokine konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Expression von CXCL9 konnte vorrangig in den Epithelzellen der Atemwege nachgewiesen werden und funktioniert über eine gleichzeitige Verringerung von IL-4 und Erhöhung von IL-12. Damit ist CXCL9 in der Lage, T-Zellen direkt über einen TH₁-Zell-Phänotyp zu aktivieren.

Tahan et al. (2006) untersuchte als einer der Ersten die belastungsinduzierten Veränderungen der Chemokine bei Asthmatikern und Gesunden. In seine Untersuchung bezog er die Chemokine CCL11 (Eotaxin), CCL5 (Rantes), CCL17

(TARC) und CCL10 (IP-10) ein. Die Plasmaanalyse und die Genexpressionsanalyse zeigten keine signifikanten belastungsinduzierten Veränderungen bei diesen Chemokinen. In der vorliegenden Studie konnte zumindest eine signifikante belastungsinduzierte Veränderung der Expression von CCL5 (Rantes) nachgewiesen werden. Vermutlich besteht hier eine Abhängigkeit von der Belastungsintensität.

Transkriptionsfaktoren

Die Veränderungen der Transkriptionsfaktoren wurden ausführlich beim Leukotrienstoffwechsel dargestellt. Hier führte die akute körperliche Belastung zu einer Hochregulation der p38MAPK und MAPK3K2 mit direkten Konsequenzen für den Aktivierungszustand der 5-LO.

Die Genregulation der asthmarelevanten Gene wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die sich an die DNA binden. In die asthmatische Inflammation sind verschiedene Transkriptionsfaktoren involviert, z.B. der Nuklearfaktor κ B (NF- κ B), das Aktivator Protein-1 (AP-1), der Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) und der signaltransduction activating nuklear factor (STAT). Ziel der aktuellen Forschung ist es, das Zusammenspiel und die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren aufzuklären, um an dieser Stelle mit der Antiasthmatherapie anzusetzen.

NF- κ B spielt eine bedeutende Rolle bei der Zellregulation. Er ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der eine besondere Rolle bei inflammatorischen und immunologischen Reaktionen einnimmt. NF- κ B kommt in zahlreichen Zellen vor. Die aktivierte Form von NF- κ B ist ein Heterodimer, welcher vorrangig aus zwei Untereinheiten besteht, p65 (RelA) und p50, obwohl auch andere Formen, wie Rel, RelB, ν -Rel, p52, p105 und p100 vorkommen (Barnes & Adcock, 1998). P50 ist grundlegend an DNA gebunden, benötigt jedoch p65 für eine transaktivationale Aktivität.

Zahlreiche Stimuli führen zu einer Aktivierung von NF- κ B, vor allem die Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-2 und GM-CSF (Siebenlist, Franzoso & Brown, 1994), oxidativer Stress (Schreck, Rieber & Baeuerle, 1991), Viren, Lipopolysaccharide sowie eine Aktivierung der B- und T-Lymphozyten. NF- κ B ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der in die Regulation der Expression dieser Gene involviert ist. Er arbeitet oftmals in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und C/EBP, die ebenfalls in die Regulation von inflammatorischen und immunologischen

Genen eingeschlossen sind (Stein & Baldwin, 1993; Stein, Baldwin et al., 1993). Zu den Genen, die durch NF- κ B beeinflusst werden, zählen die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und GM-CSF, sowie die Chemokine IL-8, MIP-1 α , RANTES und Eotaxin, die in großen Mengen vor allem in inflammatorischen Zellen produziert und zum Entzündungsherd transportiert werden (Mukaido, Morita et al., 1994; Siebenlist et al., 1994).

Des Weiteren reguliert NF- κ B die Expression inflammatorischer Enzyme, wie COX2 (Newton, Kuitert, Bergmann, Adcock & Barnes, 1997). NF- κ B spielt damit auch beim Asthma eine entscheidende Rolle, denn es konnte nachgewiesen werden, dass die meisten inflammatorischen und immunologischen Gene, die beim Asthma exprimiert werden, vorrangig durch NF- κ B reguliert werden (Barnes & Adcock, 1998). Belastungsbedingte Veränderungen von NF- κ B konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. So konnten Ji et al. (2004) nachweisen, dass in der Muskulatur von Ratten nach Belastung höhere Levels des NF- κ B bindenden Proteins und des p50 Proteins nachweisbar waren. In einer anderen Belastungsstudie liefen 12 gesunde junge Männer eine Stunde bei einer Geschwindigkeit, die der anaeroben Schwelle entsprach, untersucht wurde dabei der NF- κ B in mononukleären Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Belastung zu einem Anstieg der NF- κ B (p50/p65) Bindungsaktivität gegenüber NF- κ B übereinstimmenden Sequenzen in nuklearen Abschnitten mononuklearer Zellen im peripheren Blut führte (Weiss, Bierhaus & Kinscherf, 2002).

Die Hemmung des NF- κ B ist nach der Meinung von Popescu et al. (2003) eine neue Schlüsselstrategie in der Behandlung von Asthma. Synthetische NF- κ B-Hemmer (z.B. SP650003 oder Sp100030) sind demnach in der Lage die NF- κ B/AP-1 abhängige Gentranskription signifikant zu verringern (Popescu, 2003).

Obwohl die Fakten darauf hindeuten, dass NF- κ B eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Asthma spielt und ein belastungsinduzierter Anstieg nachgewiesen werden konnte, ist die exakte Rolle von NF- κ B und der durch eine akute Belastung hervorgerufene Anstieg im Bezug auf EIA derzeit noch unklar.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der eine enge Beziehung zum Asthma hat ist das Aktivator Protein - 1 (AP-1). AP-1 könnte über die Protein Kinase C und verschiedene Zytokine aktiviert werden. Dazu zählen TNF- α und IL-1 β , die über Protein Tyrosin Kinasen und MAP Kinasen aktiviert werden, die wiederum eine Kaskade intrazellulärer Kinasen aktivieren (Barnes & Adcock, 1998). Gene, die für

die beim Asthma produzierten Zytokine (insbesondere die TH₂ Zytokine) kodieren enthalten Bindungsseiten für NF-κB und/oder AP-1 innerhalb ihrer Promoter oder Enhancer Region (Desmet, Gosset & Henry, 2005). Es scheint also so, dass diese Gene in ihrer Expression von NF-κB und/oder AP-1 abhängig sind. In einer Belastungsstudie an Ratten konnten Hollander et al. (2001) zeigen, dass es durch eine Laufbandbelastung zu einer erhöhten AP-1 Bindung kommt. Auf der anderen Seite konnten von Desmet et al. (2005) spezifische AP-1 Inhibitoren und deren therapeutischer Wert bei der Kontrolle von bestehendem Asthma bestätigt werden. Allerdings existieren derzeit noch keine Untersuchungen, die die Relevanz von belastungsinduzierten Veränderung auf das EIA untersucht haben.

Des Weiteren existieren noch weitere Transkriptionsfaktoren, die mit Asthma in Verbindung gebracht werden können und außerdem eine belastungsinduzierte Reaktion zeigen, z.B. der Glukokortikoidrezeptor oder das NF-AT. Diese beiden stehen auch in direkter Beziehung zu NF-κB und/oder AP-1, oder STAT's, allerdings konnte ein Link zwischen den verschiedenen belastungsbedingten Veränderungen derzeit noch nicht bestätigt werden (Hilberg, 2007).

Histamin: Histamin wird von Mastzellen in verschiedenen Geweben und von basophilen Granulozyten freigesetzt (McCord, Beasley & Halliwill, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Histaminkonzentration während und nach Belastung ansteigt (Campos, Montenegro et al., 1999; Duner & Pernow, 1958; Harries, Burge, O'Brien, Cromwell & Pepys, 1979). Über die Aktivierung des H1-Rezeptors kommt es zur allergischen Reaktion. Veränderungen des H1-Rezeptors unter körperliche Belastung sind bisher unbekannt. In der vorliegenden Studie konnte aber eine geringe Zunahme des H1-Rezeptors bei den Trainierten versus Untrainierten nachgewiesen werden, wobei dies in der Clusteranalyse und im T-Test, nicht aber in der ANOVA, nachweisbar war. Damit ist dies als ein Hinweis zu werten, der in kommenden Studien erneut evaluiert werden muss.

Prostaglandin und Thromboxan: Hallstrand et al. (2005) untersuchten verschiedene Mastzellmediatoren und die Eikosanoide im Sputum bei Asthmatikern mit EIA vor und nach einer 30minütigen Belastung. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Histamin, Tryptase und der CysLT im Sputum nach der Belastung erhöht waren, wohingegen, PGE₂ und TBX₂ nach der Belastung abnahmen (Hallstrand, Moody, Wurfel et al., 2005). Enzyme, die für die Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen benötigt werden, werden u.a. von IL-1

beeinflusst, welches auch unter körperlicher Belastung freigesetzt wird. Die Prostaglandin-Synthese wird normalerweise indirekt über die Hochregulation der Genexpression der Cyclooxygenase 2 (PTGS2) induziert (Dinarello, 1988a).

Insgesamt existieren jedoch nur wenige Untersuchungen zur Expression der beiden Cyclooxygenasen nach körperlicher Belastung bei Gesunden. In der vorliegenden Studie regulierten die beiden Cyclooxygenasen in unterschiedliche Richtung, was die Aussage über die Veränderungen auf Produktebene der Prostaglandine erschwert.

Zelluläre Veränderungen – Zellentwicklung und Differenzierung

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) fördert alleine oder zusammen mit anderen inflammatorischen Stimuli, wie Lipopolysacchariden das Überleben von Neutrophilen (Lee, E., Lindo et al., 1999). Es konnte häufig gezeigt werden, dass die Bildung von Neutrophilen mit GM-CSF zu einem Anstieg der 5-LO Aktivität und der LTB₄-Produktion führt (Krump & Borgeat, 1994). GM-CSF reguliert des Weiteren die Expression und Aktivität von 5-LO in Monozyten (Radmark, O. P., 2000).

Es konnte nachgewiesen werden, dass es durch Ausdauerbelastungen zu einer erhöhten Freisetzung von GM-CSF über eine Aktivierung der Makrophagen kommt (Suzuki et al., 2002). Sogar schon nach kurzzeitigen Belastungen konnten erhöhte Konzentrationen von GM-CSF und IL-8 im Urin nachgewiesen werden, die ausgeprägter waren als die Veränderungen, die im Plasma gemessen wurden. Nach der moderaten Ausdauerbelastung in der vorliegenden Studie konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von GM-CSF, unabhängig vom Trainingszustand, nachgewiesen werden. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Studien, die zeigten, dass unmittelbar nach einem Marathon, die Belastung nur zu Veränderungen der M-CSF, jedoch nicht der GM-CSF führte (Suzuki et al., 2000).

Die inflammatorische Antwort wird durch die Ausschüttung von IL-13 und anderen TH₂-Zytokinen verstärkt.

Zusammenfassend konnte damit in dieser Studie erstmals der enge Zusammenhang zwischen veränderter Leukotrienregulation auf Transkriptionsebene und akuter körperlicher Belastung in einem größeren Probandengut nachgewiesen und die mögliche Aktivierung mit Hilfe einer Signaltransduktion über p38MAPK aufgedeckt werden. Dies kann möglicherweise bei Prädisposition eine bronchokonstriktorische Reaktion nach körperlicher Belastung verstärken oder auslösen. Daneben existieren

eine Vielzahl von Veränderungen auch bei asthmarelevanten Genen, die zukünftig näher untersucht werden müssen.

5.6 Trainingsinduzierte Veränderungen der Genexpression asthmarelevanter Gene

Ein zentrales Ergebnis der trainingsinduzierten Veränderungen war die Downregulation des PTGS1 (COX1) in der Gruppe der ausdauertrainierten Probanden. In beiden Gruppen zeigte sich darüber hinaus eine zusätzlich belastungsinduzierte Abregulation der PTGS1, die bei den Trainierten in Kombination mit der Downregulation durch Training zu deutlich erniedrigten Expressionen geführt hat, als in der Gruppe der untrainierten Probanden. Da die PTGS1 für die Bildung des bronchodilatatorisch wirksamen PGE₂ zwingend notwendig ist, könnte hier möglicherweise ein Hinweis für eine stärkere Disposition von Ausdauertrainierten für ein EIA vorliegen. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur ist nicht möglich, weil hierzu keine Studien vorliegen. Die einzige Möglichkeit einen ähnlichen Zustand zu vergleichen stellt eine Sonderform des Asthmas, das Aspirin – induzierte Asthma dar. Dabei kommt es durch die Einnahme von Aspirin vergleichbar zu einer Hemmung der Cyclooxygenase 1, welche wiederum zu einer Aktivierung des Lipooxygenase Signalweges und damit zu einem erhöhten Freiwerden von starken Bronchokonstriktoren, wie CysLT führt. Im Hinblick auf den Arachidonsäurestoffwechsel wurden bei Patienten mit Aspirin – induziertem Asthma folgende Veränderungen festgestellt: (1) eine verringerte Produktion von Prostaglandin E₂, wahrscheinlich aufgrund einer unzureichenden COX2-Regulation, (2) eine erhöhte Expression der Leukotrien C₄ – Synthase, (3) eine reduzierte Produktion der Metabolite (Lipoxine), die durch den transzellulären Metabolismus der Arachidonsäure freigesetzt werden (Picado, 2006).

Durch die vorliegende Studie konnten außer beim PTGS1 keine weiteren signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Trainingszustand auf genetischer Ebene, bei den asthmarelevanten Genen gezeigt werden. Derzeit existieren insgesamt kaum Untersuchungen zu belastungs- und trainingsinduzierten Veränderungen auf Genexpressionsebene in Bezug auf asthmarelevante Gene. Die Erkenntnis, dass körperliche Belastungen mit Veränderungen der Immunfunktion durch die Produktion von Zytokinen einhergeht, brachte einige Arbeitsgruppen dazu die Effekte von Training auf den Immunstatus zu untersuchen (Baum, Klopping-

Menke, Muller-Steinhardt, Liesen & Kirchner, 1999; Keller, Steensberg et al., 2005; Lancaster, Halson et al., 2004; Shephard, Rhind & Shek, 1994; Steinacker, Lormes, Reissnecker & Liu, 2004). Allerdings beschäftigten sich wiederum nur wenige mit der Zytokinantwort innerhalb von Trainingsstudien, was die organisatorischen und logistischen Probleme unterstreicht, die mit einer gut kontrollierten Längsschnittstudie verbunden sind.

Die wesentlichen Ergebnisse von Trainingsstudien sollen hier aber kurz zusammengefasst werden:

Baum et al. (1999) absolvierten über 12 Wochen (3-5 h/ Woche) mit 8 Personen ein moderates Lauftraining. Neben den typischen Trainingseffekten, wie verbesserte Laufgeschwindigkeit an der fixen anaeroben Schwelle (4 mmol/l) konnten eine erhöhte Synthese von IL-1 β und IL-6, jedoch keine Veränderungen bei IL-2 oder IFN- γ nachgewiesen werden.

Rhind et al. (1996) untersuchten die Effekte eines 12wöchigen moderaten Ausdauerprogramms an neun gesunden untrainierten Probanden und sechs Kontrollpersonen ($VO_2\text{max}$ = 40,6ml/kg/min). Die aktiven Probanden belasteten sich im Untersuchungszeitraum 4 – 5-mal/ Woche für jeweils 30 Minuten bei 65 – 70% der $VO_2\text{max}$. Außerdem wurde zu Beginn und am Ende des Untersuchungszeitraums eine 60minütige Belastung bei 60% der $VO_2\text{max}$ durchgeführt. Neben der trainingsbedingten Zunahme der $VO_2\text{max}$ um ca. 20% bei der Trainingsgruppe, konnte gezeigt werden, dass das Training eine signifikante Verminderung der Suppression der IL-2 Produktion zur Folge hatte. Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten keinen Einfluss von Ausdauertraining auf die IL-2 Produktion nachweisen. Weicher et al. (1991) berichteten, dass ein viermonatiges Training keine Veränderungen auf das zirkulierende IL-2 in Ruhe oder nach einer kurzzeitigen Belastung zur Folge hatte.

In einer Tierstudie an Mäusen wurden verschiedene Aspekte eines moderaten Ausdauerschwimmtrainings untersucht (Kim, C. H. & Kwak, 2004). Die Trainingsgruppe wurde über 10 Wochen beim regelmäßigen Schwimmtraining untersucht. Auch hier kam es zu den erwartenden trainingsbedingten Anpassungen, wie eine Abnahme des Körpergewichts und auf Zytokinebene zu einer Zunahme der IL-4 Konzentration. Kim & Kwak (2004) beschrieben, dass es einen Link zwischen regelmäßigem Ausdauertraining, in diesem Fall Schwimmtraining, und dem Auftreten von Allergien (hier z.B. EIA aufgeführt) gibt. In der vorliegenden Studie konnte keine

Abhängigkeit vom Trainingszustand auf die IL-4 Genexpression nachgewiesen werden konnten. Es konnte vergleichbar zur vorliegenden Studie auch in anderen Studien nachgewiesen werden, dass es durch körperliche Belastung zu einer Aktivierung der p38MAPK bei Untrainierten (Aronson, Violan et al., 1997; Boppart, Aronson et al., 2000; Widgren, Jiang et al., 1998) sowie bei moderat Trainierten (Boppart, Asp et al., 2000; Yu, Blomstrand, Chibalin, Krook & Zierath, 2001) kommt. In einer Studie von Yu et al. (2003) wurden des Weiteren die trainingsabhängigen Veränderungen verschiedener MAPK-Signalwege untersucht. Sieben hochausdauertrainierte Radfahrer ($VO_{2max} = 67,4$ ml/kg/min) absolvierten acht Einheiten á fünf Minuten bei ~85% der VO_{2max} mit 60 Sekunden Erholung zwischen den Einheiten. Die Untrainierten ($VO_{2max} = 49,9$ ml/kg/min) absolvierten 4 Einheiten á 5 Minuten bei der gleichen relativen Belastung. Damit waren die beiden Gruppen hinsichtlich des Trainingszustandes fast identisch mit den Probanden aus der vorliegenden Studie. Letztendlich konnte durch Yu et al. (2003) nachgewiesen werden, dass die belastungsinduzierten Signalprozesse bei den Untrainierten, bei gleicher relativer Belastung, größer waren, als bei den Trainierten. Die Ursache sehen Yu et al. darin, dass die Muskulatur von gut ausdauertrainierten Athleten einen größeren Stimulus benötigen, um die Signaltransduktion dieser Pathways zu aktivieren. Auch bei der vorliegenden Arbeit war zu erkennen, dass die Aktivierung von MAPK14 bei den Untrainierten etwas größer war als bei den Trainierten, ein trainingsinduzierter signifikanter Effekt war jedoch nicht nachzuweisen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie eine Downregulation von PTGS1 bei ausdauertrainierten Probanden nachgewiesen werden konnte, was eine mögliche Prädisposition zu EIA verstärken kann.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Hochleistungssport im Ausdauerbereich geht mit einer hohen Prävalenz für Exercise-induced asthma (EIA) bei den Sportlern einher. Verschiedene Theorien erklären einen Teil der pathologischen Mechanismen, das komplette pathologische Geschehen liegt aber noch weitgehend im Unklaren. Ein klares, auf pathophysiologischen Grundlagen beruhendes Behandlungsregime zur Behandlung eines EIA im Hochleistungssport liegt deshalb bisher nicht vor. Zusätzlich ist die Anwendung anti-asthmatischer Medikamente auch aus dopingspezifischer Sicht immer kritisch zu hinterfragen.

Einigkeit besteht darüber, dass molekulare Mechanismen - insbesondere im Leukotrien-, Prostaglandin- und Histaminstoffwechsel - bedeutsam für das Bild des EIA sind. In der vorliegenden Studie wurden erstmals systematisch die molekularen Regulationsmechanismen im Bereich der Genexpression asthmarelevanter Gene bei ausdauertrainierten Sportlern im Vergleich zu Untrainierten untersucht.

20 ausdauertrainierte Sportler mit einer rel. VO_2max im Mittel von 68,3 ml/kg/min und 17 untrainierte Personen mit einer rel. VO_2max von 46,3 ml/kg/min wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Probanden absolvierten eine Ausdauerbelastung mit 80% der IAS über 90 min. Blutentnahmen für die laborchemische Analytik erfolgten zum Zeitpunkt vor und direkt, 45 min und 2 Stunden nach Belastung. Für die genspezifische Untersuchung wurde die Mikroarray-Technik (SIRS-Lab GmbH) zur Überprüfung von >5000 Genen eingesetzt; hierzu wurden die Blutabnahmen vor und 45min nach Belastung verwendet.

Nach der körperlichen Belastung konnten Veränderungen der Genexpression bei 18 asthmarelevanten Genen nachgewiesen werden. Dabei fielen insbesondere die signifikanten Veränderungen im Leukotrienstoffwechsel auf. Es konnte nun erstmals an einer größeren Gruppe gezeigt werden, dass es zu einer belastungsinduzierten Hochregulation der ALOX5 (codiert die 5-Lipoxygenase) und des ALOX5AP (codiert FLAP) unabhängig von der ausdauerspezifischen Leistungsfähigkeit kommt. Zusätzlich zu der vermutlich hierdurch vermehrt induzierten Enzymmasse wurde die 5-Lipoxygenase über p38MAPK vermittelte Phosphorylierungsvorgänge verstärkt aktiviert. Eine erhöhte Expression der p38MAPK konnte in beiden Gruppen nach Belastung nachgewiesen werden.

Zusätzlich kam es noch zu einer signifikanten Hochregulation weiterer asthmaspezifischer Gene wie IL-1R1 und IL-1R2, TNF- α , IL-8, GM-CSF, HRH1, MAPK14, MAP3K2 und PTGS2 und zu einer Abregulation von CCL5, IL-2RA und IL-2RG, IL-10, IL-13, PTGS1 und TBXAS1.

Trainingsspezifische Veränderungen konnten bei der PTGS1 nachgewiesen werden. Hier führt die trainingsbedingte Downregulation von PTGS1 zu einer möglichen Reduktion von PGE₂, einem stark bronchodilatatorisch wirksamen Mediator. Diese Expressionsveränderung kann möglicherweise einen molekularen Mechanismus darstellen, weshalb das EIA insbesondere bei Ausdauertrainierten gehäuft auftritt.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, eine akute körperliche Ausdauerbelastung führt zur Hochregulation und Aktivierung des Leukotrienstoffwechsels, was in Verbindung mit entsprechender Prädisposition zu einem EIA führen kann. Chronischer Ausdauersport scheint zu einer Downregulation von PTGS1 und damit möglicherweise zu einer verminderten PGE₂ Bildung zu führen, was eine bronchodilatatorische Wirkung vermindert und trainingsinduziert die Prädisposition zum EIA zusätzlich fördert.

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass der Ausdauersport sowohl akut, wie auch im Trainingsprozess, auf molekularer Ebene zur Triggerung des EIA beiträgt. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse muss der Einsatz von Leukotrienantagonisten in der Therapie des EIA's stärker diskutiert werden, zumal der Einsatz von lang wirkenden Beta-Agonisten aufgrund der höheren Zahl an Todesfällen nach neusten Studien kritischer bewertet werden muss (Salpeter, Buckley, Ormiston & Salpeter, 2006). Hier wurde eine erhöhte Zahl schwerer Exazerbationen und Todesfällen unter Einnahme z. B. von Salmeterol als Aerosol aufgeführt, welches auch im Hochleistungssport erlaubt ist.

Als Zukunftsperspektiven aus dieser Studie heraus ergeben sich folgende Ansätze:

1. Untersuchung molekularbiologischer Veränderungen auf mRNA-Ebene bei Sportlern mit bekanntem EIA versus Sportlern ohne EIA. Hier bietet sich an, dies in einer multizentrischen Studie durchzuführen.
2. Einsatz von Leukotrienantagonisten und Veränderungen im Genexpressionsmuster und der klinischen Symptome von Leistungssportlern, zunächst als Überprüfung in Form einer klinischen Studie.

3. Entwicklung eines auf pathophysiologischen Grundlagen, klinischen Studien und entsprechenden individuellen Voruntersuchungen beruhenden Behandlungsregimes.

Diese Forschungsansätze dienen dem einen Gesamtziel, dem Hochleistungssportler die Möglichkeit zu sichern, auch bei vorliegender Prädisposition für ein EIA, einen Wettkampf bzw. sein Training möglichst ohne Symptomatik, mit einem sicheren Medikament ohne Dopingproblematik, erfolgreich absolvieren zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Abramovitz, M., Wong, E., Cox, M. E., Richardson, C. D., Li, C. & Vickers, P. J. (1993). 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem*, 215, 105-11.
- Abu-Hasan, M., Tannous, B. & Weinberger, M. (2005). Exercise-induced dyspnea in children and adolescents: if not asthma then what? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94, 366-71.
- Aharony, D. (1998). Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, S214-8; discussion S8-9, S47-8.
- Anderson, S. D. (1984). Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma? *J Allergy Clin Immunol*, 73, 660-5.
- Anderson, S. D. (1985). Issues in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 76, 763-72.
- Anderson, S. D. (2002). Exercise-induced asthma in children: a marker of airway inflammation. *Med J Aust*, 177 Suppl, S61-3.
- Anderson, S. D. (2006). How does exercise cause asthma attacks? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 6, 37-42.
- Anderson, S. D. & Brannan, J. D. (2002). Exercise-induced asthma: is there still a case for histamine? *J Allergy Clin Immunol*, 109, 771-3.
- Anderson, S. D. & Daviskas, E. (2000). The mechanism of exercise-induced asthma is ... *J Allergy Clin Immunol*, 106, 453-9.
- Anderson, S. D. & Holzer, K. (2000). Exercise-induced asthma: is it the right diagnosis in elite athletes? *J Allergy Clin Immunol*, 106, 419-28.
- Anderson, S. D. & Kippelen, P. (2005). Exercise-induced bronchoconstriction: pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 5, 116-22.
- Aronson, D., Violan, M. A., Dufresne, S. D., Zangen, D., Fielding, R. A. & Goodyear, L. J. (1997). Exercise stimulates the mitogenic-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 99, 1251-7.
- Baggiolini, M. & Dahinden, C. (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today*, 15, 127-33.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 55, 97-179.
- Barnes, P. J. & Adcock, I. M. (1998). Transcription factors and asthma. *Eur Respir J*, 12, 221-34.

- Baum, M., Klopping-Menke, K., Muller-Steinhardt, M., Liesen, H. & Kirchner, H. (1999). Increased concentrations of interleukin 1-beta in whole blood cultures supernatants after 12 weeks of moderate endurance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 79, 500-3.
- Baumann, H. & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today*, 15, 74-80.
- Baumann, H., Morella, K. K. & Campos, S. P. (1993). Interleukin-6 Signal Communication to the $\alpha 1$ -Acid Glycoprotein Gene, but Not junB Gene, Is Impaired in HTC Cells. *J Biol Chem*, 268, pp. 10495-500.
- Belcher, N. G., O'Hickey, S., Arm, J. P. & Lee, T. H. (1988). Pathogenetic mechanisms of exercise-induced asthma and the refractory period. *N Engl J Med*, 9, 199-201.
- Bischoff, S., Kriger, M., Brunner, T., Rot, A., von Tscharner, V., Baggiolini, M. & Dahinden, C. (1993). RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol*, 23, 761-7.
- Bisset, L. R. & Schmid-Grendelmeier, P. (2005). Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med*, 11, 35-42.
- Bonsignore, M. R., Morici, G., Vignola, A. M., Riccobono, L., Bonanno, A., Profita, M., Abate, P., Scichilone, N., Amato, G., Bellia, V. & Bonsignore, G. (2003). Increased airway inflammatory cells in endurance athletes: what do they mean? *Clin Exp Allergy*, 33, 14-21.
- Boppart, M. D., Aronson, D., Gibson, L., Roubenoff, R., Abad, L. W., Bean, J. & Goodyear, L. J. (2000). Eccentric exercise markedly increase c-Jun NH2-terminal kinase activity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 87, 1668-73.
- Boppart, M. D., Asp, S., Wojtaszewski, J. F. P., Fielding, R. A., Mohr, T. & Goodyear, L. J. (2000). Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle. *J Physiol*, 526, 663-9.
- Bortz, J., Döring, N. & Bortz, D. (2003). *Forschungsmethoden und Evaluation : für Human- und Sozialwissenschaftler ; mit 80 Abbildungen und 70 Tabellen* (3., überarb. Aufl., Nachdr). Berlin u.a.: Springer.
- Brenner, I., Shek, P. N., Zamecnik, J. & Shephard, R. J. (1998). Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med*, 19, 130-43.
- Brenner, I. K., Natale, V. M., Vasiliou, P., Moldoveanu, A. I., Shek, P. N. & Shephard, R. J. (1999). Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 80, 452-60.
- Brock, T. G., McNish, R. W. & Peters-Golden, M. (1995). Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. *J Biol Chem*, 270, 21652-8.

- Bruunsgaard, H., Galbo, H. & Halkjaer-Kristensen, J. (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol (Lond)*, 499, 833-41.
- Bürkert, E., Szellas, D., Radmark, O., Steinhilber, D. & Werz, O. (2003). Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid. *Journal of Leukocyte Biology*, 73, 191-200.
- Burmester, G.-R., Pezzutto, A. & Ulrichs, T. (1998). *Taschenatlas der Immunologie : Grundlagen, Labor, Klinik*. Stuttgart u.a.: Thieme.
- Busse, W. & Kraft, M. (2005). Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: strategic target for therapy. *Chest*, 127, 1312-26.
- Busse, W. W. (1998). Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, S210-3; discussion S47-8.
- Busse, W. W. & Lemanske, R. F., Jr. (2001). Asthma. *N Engl J Med*, 344, 350-62.
- Byrum, R. S., Goulet, J. L., Griffiths, R. J. & Koller, B. H. (1997). Role of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in murine acute inflammatory responses. *J Exp Med*, 185, 1065-75.
- Caillaud, C., Le Creff, C., Legros, P. & Denjean, A. (2003). Strenuous exercise increases plasmatic and urinary leukotriene E4 in cyclists. *Can J Appl Physiol*, 28, 793-806.
- Cameron-Smith, D. (2002). Exercise and skeletal muscle gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29, 209-13.
- Campos, H., Montenegro, M., Velasco, M., Romero, E., Alvarez, R. & Urbina, A. (1999). Treadmill exercise-induced stress causes a rise of blood histamine in normotensive but not primary hypertensive humans. *Eur J Pharmacol*, 383, 69-73.
- Capao-Filipe, M., Moreira, A., Delgado, L., Rodrigues, J. & Vaz, M. (2003). Exercise-induced bronchoconstriction and respiratory symptoms in elite athletes. *Allergy*, 58, 1196.
- Carlsen, K. H. & Carlsen, K. C. (2002). Exercise-induced asthma. *Paediatr Respir Rev*, 3, 154-60.
- Castell, L. M., Poortmans, J. R., Leclercq, R., Brasseur, M., Duchateau, J. & Newsholme, E. A. (1997). Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 75, 47-53.
- Chaudhuri, J. D. (2005). Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med Sci Monit*, 11, RA52-62.
- Chavez, J., Young, H. W. J., Corry, D. B. & Lieberman, M. W. (2006). Interactions Between Leukotriene C4 and Interleukin 13 Signaling Pathways in a Mouse Model of Airway Disease. *Arch Pathol Lab Med*, 130, 440-6.

- Choudhuri, S. (2004). Microarrays in Biology and Medicine. *J Biochem Molecular Toxicology*, 18, 171-9.
- Christie, P. & Henderson, W. R., Jr., (2002). Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin Allergy Immunol*, 16, 233-54.
- Ciprandi, G., Frati, F., Marcucci, F., Sensi, L., Tosca, M. A., Milanese, M. & Ricca, V. (2003). Nasal cytokine modulation by montelukast in allergic children: a pilot study. *Allerg Immunol (Paris)*, 35, 295-9.
- Cohn, L., Elias, J. A. & Chupp, L. G. (2003). ASTHMA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 789-815.
- Colantonio, L., Iellem, A. & Clissi, B. (1999). Upregulation of integrin alpha6/beta1 and chemokine receptor CCR1 by interleukin-12 promotes the migration of human type 1 helper T cells. *Blood*, 94, 2981-9.
- Collins, P., Weg, V., Faccioli, L., Watson, M., Moqbel, R. & Williams, T. (1993). Eosinophil accumulation induced by human interleukin-8 in the guinea-pig in vivo. *Immunology*, 79, 312-8.
- Connolly, P. H., Caiozzo, V. J., Zaldivar, F., Nemet, D., Larson, J., Hung, S. P., Heck, J. D., Hatfield, G. W. & Cooper, D. M. (2004). Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol*, 97, 1461-9.
- Cummiskey, J. (2001). Exercise-induced asthma: an overview. *Am J Med Sci*, 322, 200-3.
- de Marées, H. & Heck, H. (2002). *Sportphysiologie* (9., vollst. überarb. und erw. Aufl. /). Köln: Sport und Buch Strauß.
- de Marées, H. & Heck, H. (2003). *Sportphysiologie* (9., vollst. überarb. und erw. Aufl., korr. Nachdr. /). Köln: Sport und Buch Strauß.
- Desmet, C., Gosset, P. & Henry, E. (2005). Treatment of experimental asthma by decoy-mediated local inhibitor of activator protein-1. *Am J Respir Crit Care Med*, 172, 671-8.
- Dinarello, C. A. (1988a). Biology of interleukin 1. *Faseb J*, 2, 108-15.
- Dinarello, C. A. (1988b). Interleukin-1. *Dig Dis Sci*, 33, 25S-35S.
- Dixon, R. A., Diehl, R. E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P. J., Evans, J. F., Gillard, J. W. & Miller, D. K. (1990). Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, 343, 282-4.
- Drazen, J. M. (1998). Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 158, S193-200.
- Drazen, J. M. (1999). Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action. *Proc Assoc Am Physicians*, 111, 547-59.

- Drazen, J. M., Israel, E. & O'Byrne, P. M. (1999). Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med*, 340, 197-206.
- Dubois, C., Bissonette, E. & Rola-Pleszczynski M. (1989). Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. *Am Rev Respir Dis*, 139, 1257-64.
- Dufaux, B. & Order, U. (1989). Plasma elastase-alpha 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int J Sports Med*, 10, 434-8.
- Duner, H. & Pernow, B. (1958). Histamine and leukocytes in blood during muscular work in man. *Scand J Clin Lab Invest*, 10, 394-6.
- Edelman, J. M., Turpin, A. T., Bronsky, E. A., Grossman, J., Kemp, J. P., Ghannam, A. F., DeLucca, P. T., Gormley, G. J. & Pearlman, D. S. (2000). Oral Montelukast Compared with Inhaled Salmeterol To Prevent Exercise-Induced Bronchoconstriction. *Ann Intern Med*, 132, 97-104.
- Engel, K., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (1998). Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J*, 17, 3361-71.
- Fallon, K. E., Fallon, S. K. & Boston, T. (2001). The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br J Sports Med*, 35, 170-3.
- Farooque, S. P. & Lee, T. H. (2003). Exercise-induced asthma: a review. *Practitioner*, 247, 279-85, 88.
- Fehrenbach, E., Niess, A. M., Schlotz, E., Passek, F., Dickhuth, H. H. & Northoff, H. (2000). Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol*, 89, 704-10.
- Fehrenbach, E., Zieker, D., Niess, A. M., Moeller, E., Russwurm, S. & Northoff, H. (2003). Microarray technology--the future analyses tool in exercise physiology? *Exerc Immunol Rev*, 9, 58-69.
- Fielding, R. A., Manfredi, T. J., Ding, W., Fiatarone, M. A., Evans, W. J. & Cannon, J. G. (1993). Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 265, R166-72.
- Fireman, P. (2003). Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc*, 24, 79-83.
- Flamand, N., Lefebvre, J., Surette, M., Picard, S. & Borgeat, P. (2006). Arachidonic Acid Regulates the Translocation of 5-Lipoxygenase to the Nuclear Membranes in Human Neutrophils. *J Biol Chem*, 281, 129-36.
- Fulkerson, P. C., Zimmermann, N., Brandt, E. B., Muntel, E. E., Doecker, M. P., Kavanaugh, J. L., Mishra, A., Witte, D. P., Zhang, H., Farber, J. M., Yang, M., Foster, P. S. & Rothenberg, M. E. (2004). Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-gamma (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1987-92.

- Furuichi, S., Hashimoto, S., Gon, Y., Matsumoto, K. & Horie, T. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH₂-terminal kinase regulate interleukin-8 and RANTES production in hyperosmolarity stimulated human bronchial epithelial cells. *Respirology*, 7, 193-200.
- Gabriel, H. (2000). *Sport und Immunsystem : Modulationen und Adaptionen der Immunität durch Belastung und Training*. Schorndorf: Hofmann.
- Gabriel, H. & Kindermann, W. (1997). The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Sports Med*, 18 Suppl 1, S28-45.
- Gabriel, H., Müller, H. J. & Kindermann, W. (2000). Die Akute-Phase-Reaktion. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 51, 31-2.
- Gabriel, H., Schwarz, L., Steffens, G. & Kindermann, W. (1992). Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med*, 13, 359-66.
- Gabriel, H., Urhausen, A. & Kindermann, W. (1992). Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 65, 164-70.
- Gemsa, D., Vorlaender, K. O. & Albert, E. (1997). *Immunologie : Grundlagen, Klinik, Praxis ; 224 Tabellen* (4., neubearb. und erw. Aufl). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Giesbrecht, G. G. & Younes, M. (1995). Exercise- and cold-induced asthma. *Can J Appl Physiol*, 20, 300-14.
- Gmünder, F. K. (2000). *Sport und Immunologie*. [Homepage]. Verfügbar unter: <http://www.gmuender.org/si/>
- Goldspink, G. (2003). Gene expression in muscle in response to exercise. *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 121-6.
- Grieco, A. J. & Burstein-Stein, J. (2000). Oral montelukast versus inhaled salmeterol to prevent exercise-induced bronchoconstriction. *Ann Intern Med*, 133, 392; author reply -3.
- Hacia, J. G. (1999). Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet*, 21, 42-7.
- Hallstrand, T. S., Moody, M. W., Aitken, M. L. & Henderson, W. R., Jr. (2005). Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 586-93.
- Hallstrand, T. S., Moody, M. W., Wurfel, M. M., Schwartz, L. B., Henderson, W. R., Jr. & Aitken, M. L. (2005). Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med*, 172, 679-86.
- Hammarberg, T. & Radmark, O. (1999). 5-lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry*, 38, 4441-7.

- Hanaka, H., Shimizu, T. & Izumi, T. (2005). Stress-induces nuclear export of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 111-6.
- Hansen-Flaschen, J. & Schotland, H. (1998). New treatments for exercise-induced asthma. *N Engl J Med*, 339, 192-3.
- Harries, M., Burge, P., O'Brien, I., Cromwell, O. & Pepys, J. (1979). Blood histamine levels after exercise testing. *Clin Allergy*, 9, 437-41.
- Hashimoto, S., Gon, Y., Matsumoto, K., Takeshita, I., Maruoka, S. & Horie, T. (2000). Inhalant corticosteroids inhibit hyperosmolarity-induced, and cooling and rewarming-induced interleukin-8 and RANTES production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, 1075-80.
- Hashimoto, S., Matsumoto, K., Gon, Y., Nakayama, T., Takeshita, I. & Horie, T. (1999). Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 634-40.
- Hedi, H. & Norbert, G. (2004). 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J Biomed Biotech*, 2, 99-105.
- Helenius, I. J., Tikkanen, H. O. & Haahtela, T. (1998). Occurrence of exercise induced bronchospasm in elite runners: dependence on atopy and exposure to cold air and pollen. *Br J Sports Med*, 32, 125-9.
- Helms, P. J. (2005). Exercise induced asthma: real or imagined? *Arch Dis Child*, 90, 886-7.
- Henderson, W. R., Jr. (1994a). Role of leukotrienes in asthma. *Ann Allergy*, 72, 272-8.
- Henderson, W. R., Jr. (1994b). The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*, 121, 684-97.
- Hendrickson, C. D., Lynch, J. M. & Gleeson, K. (1994). Exercise induced asthma: a clinical perspective. *Lung*, 172, 1-14.
- Herm, K. P. (2003). Methoden der Körperfettbestimmung. *Deutsche Zeitschrift Fur Sportmedizin*, 54, 153-4.
- Hermansen, C. L. (2004). Exercise-induced bronchospasm vs. exercise-induced asthma. *Am Fam Physician*, 69, 808; author reply , 10.
- Hilberg, T. (2007). Etiology of Exercise-Induced Asthma: Physical Stress-Induced Transcription. *Curr Allergy Asthma Rep (in press)*.
- Hilberg, T., Dignier, H. P., Moller, E., Claus, R. A., Ruryk, A., Glaser, D., Landre, J. B., Brunkhorst, F. M., Reinhart, K., Gabriel, H. H. & Russwurm, S. (2005). Transcription in response to physical stress-clues to the molecular mechanisms of exercise-induced asthma. *Faseb J*.

- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H. & Ji, L. L. (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 442, 426-34.
- Honda, K., Arima, M., Cheng, G., Taki, S., Hirata, H., Eda, F., Fukushima, F., Yamaguchi, B., Hatano, M., Tokuhisa, T. & Fukuda, T. (2003). Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J Exp Med*, 198, 533-43.
- Izumi, T., Yokomizo, T., Obinata, H., Ogasawara, H. & Shimizu, T. (2002). Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, 132, 1-6.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N. & Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J*, 18, 1499-506.
- John, A. E. & Lukacs, N. W. (2003). Chemokines and asthma. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 20, 180-9.
- Jourdan, P., Abbal, C. & Noraz, N. (1998). IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol*, 160, 4153-7.
- Joyeux, M., Godin-Ribuot, D., Yellon, D. M., Demenge, P. & Ribuot, C. (1999). Heat stress response and myocardial protection. *Fundam Clin Pharmacol*, 13, 1-10.
- Kappel, M., Tvede, N., Galbo, H., Haahr, P. M., Kjaer, M., Linstow, M., Klarlund, K. & Pedersen, B. K. (1991). Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J Appl Physiol*, 70, 2530-4.
- Kato, K., Yokomizo, T., Izumi, T. & Shimizu, T. (2000). Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B4 receptor gene. *J Exp Med*, 192, 413-20.
- Kay, A. B. (1988). Leucocytes in asthma. *Immunol Invest*, 17, 679-705.
- Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A. K., Fischer, C. P., Plomgaard, P. & Pedersen, B. K. (2005). Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 99, 2075-9.
- Kelly-Welch, A. E., Hanson, E. M., Boothby, M. R. & Keegan, A. D. (2001). Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connection Maps. *Science*, 300, 1527-8.
- Kikawa, Y., Miyanomae, T., Inoue, Y., Saito, M., Nakai, A., Shigematsu, Y., Hosoi, S. & Sudo, M. (1992). Urinary leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 89, 1111-9.
- Kim, C. H. & Kwak, Y. S. (2004). Swim training increases ovalbumin induced active systemic anaphylaxis in mice. *Immunol Invest*, 33, 469-80.
- Kim, Y. B., Inoue, T., Nakajima, R., Shirai-Morishita, Y., Tokuyama, K. & Suzuki, M. (1999). Effect of long-term exercise on gene expression of insulin signaling

- pathway intermediates in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 720-7.
- Kindermann, W. (1984). Grundlagen der aeroben und anaeroben Leistungsdiagnostik: ZWKS.
- Kindermann, W. (2004). Anaerobe Schwelle. *Dtsch Z Sportmed*, 55, 161-2.
- King, D. E., Carek, P., Mainous, A. G., 3rd & Pearson, W. S. (2003). Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med Sci Sports Exerc*, 35, 575-81.
- Kivity, S., Argaman, A., Onn, A., Shwartz, Y., Man, A., Greif, J. & Fireman, E. (2000). Eosinophil influx into the airways in patients with exercise-induced asthma. *Respir Med*, 94, 1200-5.
- Klimek, L. & Hansen, I. (2003). Spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen. *Klinikerarzt*, 32, 128-34.
- Krump, E. & Borgeat, P. (1994). Kinetics of 5-lipoxygenase activation, arachidonic acid release, and leukotriene synthesis in human neutrophils—effects of granulocyte–macrophage colony-stimulating factor. *Biochim Biophys Acta*, 1213, 135-9.
- Lancaster, G. I., Halson, S. L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T. & Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev*, 10, 91-106.
- Lee, E., Lindo, T., Jackson, N., Meng-Choong, L., Reynolds, P., Hill, A., Haswell, M., Jackson, S. & Kilfeather, S. (1999). Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, 2079-85.
- Lee, T. H., Nagakura, T., Papageorgiou, N., Cromwell, O., Ikura, Y. & Kay, A. B. (1984). Mediators in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 73, 634-9.
- Leff, J. A., Busse, W. W., Pearlman, D., Bronsky, E. A., Kemp, J., Hendele, L., Dockhorn, R., Kundu, S., Zhang, J., Seidenberg, B. C. & Reiss, T. F. (1998). Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med*, 339, 147-52.
- Leslie, C. C. (1997). Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*, 272, 16709-12.
- Li, J. T. (1998). Non-allergy for the Allergist. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81, pp. 275.
- Löffler, G., Petrides, P. E. & Löffler, P. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie : mit 218 Tabellen ; [mit Poster]* (7., völlig neu bearb. Aufl). Berlin [u.a.]: Springer.

- MacLean, P. S., Zheng, D. & Dohm, G. L. (2000). Muscle glucose transporter (GLUT 4) gene expression during exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, 28, 148-52.
- Mannix, E. T., Roberts, M., Fagin, D. P., Reid, B. & Farber, M. O. (2003). The prevalence of airways hyperresponsiveness in members of an exercise training facility. *J Asthma*, 40, 349-55.
- Mastalerz, L., Gawlewicz-Mroccka, A., Nizankowska, E., Cmiel, A. & Szczeklik, A. (2002). Protection against exercise-induced bronchoconstriction by montelukast in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients with asthma. *Clin Exp Allergy*, 32, 1360-5.
- Mattusch, F., Dufaux, B., Heine, O., Mertens, I. & Rost, R. (2000). Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine month of endurance training. *Int J Sports Med*, 21, 21-4.
- McCain, R., Holden, E., Blackwell, T. & Christman, J. (1994). Leukotriene B₄ stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*, 10, 651-7.
- McCord, J. L., Beasley, J. M. & Halliwill, J. R. (2006). H₂-receptor-mediated vasodilation contributes to postexercise hypotension. *J Appl Physiol*, 100, 67-75.
- McFadden, E. R., Jr. & Gilbert, I. A. (1994). Exercise-induced asthma. *N Engl J Med*, 330, 1362-7.
- Mellion, M. B. & Kobayashi, R. H. (1992). Exercise-induced asthma. *Am Fam Physician*, 45, 2671-7.
- Meyer, T., Gabriel, H. H., Ratz, M., Muller, H. J. & Kindermann, W. (2001). Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc*, 33, 549-55.
- Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J. & Shek, P. N. (2000). Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol*, 89, 1499-504.
- Mooren, F. C., Lechtermann, A., Pospiech, S., Fromme, A., Thorwesten, L. & Volker, K. (2001). Decoupling of intracellular calcium signaling in granulocytes after exhaustive exercise. *Int J Sports Med*, 22, 323-8.
- Mukaido, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T. & Matsushima, K. (1994). Novel mechanisms of glucocorticoid-mediated IL-8 gene expression. *J Biol Chem*, 269, 13289-95.
- Müller, H.-J. & Röder, T. (2004). *Der Experimentator: Microarrays* (1. Aufl). München: Elsevier Spektrum.
- Nassar, G. M., Montero, A., Fukunaga, M. & Badr, K. F. (1997). Contrasting effects of proinflammatory and T-helper lymphocyte subset-2 cytokines on the 5-lipoxygenase pathway in monocytes. *Kidney Int*, 51, 1520-8.

- Natelson, B. H., Zhou, X., Ottenweller, J. E., Bergen, M. T., Sisto, S. A., Drastal, S., Tapp, W. N. & Gause, W. L. (1996). Effect of acute exhausting exercise on cytokine gene expression in men. *Int J Sports Med*, 17, 299-302.
- NCBI. (2006). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Neidhart, M., Muller-Ladner, U., Frey, W., Bosserhoff, A. K., Colombani, P. C., Frey-Rindova, P., Hummel, K. M., Gay, R. E., Hauselmann, H. & Gay, S. (2000). Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage*, 8, 222-9.
- Newton, R., Kuitert, L. M., Bergmann, M., Adcock, I. M. & Barnes, P. J. (1997). Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 28-32.
- Nieman, D. C., Davis, J. M., Brown, V. A., Henson, D. A., Dumke, C. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Downs, M. F., Smith, J. C., Carson, J., Brown, A., McAnulty, S. R. & McAnulty, L. S. (2004). Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. *J Appl Physiol*, 96, 1292-8.
- Nieman, D. C., Davis, J. M., Henson, D. A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Carson, J. A., Brown, A., Lee, W. J., McAnulty, S. R. & McAnulty, L. S. (2003). Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol*, 94, 1917-25.
- Niess, A. M., Fehrenbach, E., Lehmann, R., Opavsky, L., Jesse, M., Northoff, H. & Dickhuth, H. H. (2003). Impact of elevated ambient temperatures on the acute immune response to intensive endurance exercise. *Eur J Appl Physiol*, 89, 344-51.
- Niess, A. M., Passek, F., Lorenz, I., Schneider, E. M., Dickhuth, H. H., Northoff, H. & Fehrenbach, E. (1999). Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes—acute and adaptional responses to endurance exercise. *Free Radic Res*, 26, 184-92.
- Noguchi, M., Miyano, M., Matsumoto, T. & Noma, M. (1994). Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA4 synthetase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1215, 300-6.
- Nordsborg, N., Bangsbo, J. & Pilegaard, H. (2003). Effect of high-intensity training on exercise-induced gene expression specific to ion homeostasis and metabolism. *J Appl Physiol*, 95, 1201-6.
- Northoff, H. & Berg, A. (1991). Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med*, 12 Suppl 1, S9-15.
- Northoff, H., Weinstock, C. & Berg, A. (1994). The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med*, 15 Suppl 3, S167-71.
- Nystad, W. (2000). Asthma. *Int J Sports Med*, 21 Suppl 2, S98-102.

- O'Byrne, P. M. (1997). Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. *Chest*, 111, 27S-34S.
- Ostrowski, K., Rohde, T. & Asp, S. (1998). The sequential release of cytokines in strenuous exercise. *Int J Sports Med*, 19, S216-7.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*, 515 (Pt 1), 287-91.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S. & Pedersen, B. K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*, 508 (Pt 3), 949-53.
- Pande, A., Moc, D., Nemec, K., Qiu, S., Tan, S. & Tatulian, S. (2004). Modulation of Human 5-Lipoxygenase Activity by Membrane Lipids. *Biochemistry*, 42, 14653-66.
- Pande, A., Qin, S. & Tatulian, S. (2005). Membrane Fluidity Is a Key Modulator of Membrane Binding, Insertion, and Activity of 5-Lipoxygenase. *Biophysical J*, 88, 4084-94.
- Pedersen, B. K. & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80, 1055-81.
- Pedersen, B. K., Ostrowski, K., Rohde, T. & Bruunsgaard, H. (1998). The cytokine response to strenuous exercise. *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 505-11.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A. & Schjerling, P. (2001). Exercise and interleukin-6. *Curr Opin Hematol*, 8, 137-41.
- Peroni, D. G., Piacentini, G. L., Pietrobelli, A., Loiacono, A., De Gasperi, W., Sabbion, A., Micciolo, R. & Boner, A. L. (2002). The combination of single-dose montelukast and loratadine on exercise-induced bronchospasm in children. *Eur Respir J*, 20, 104-7.
- Peters-Golden, M. (1998). Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, S227-31; discussion S31-2, S47-8.
- Peters-Golden, M. & McNish, R. W. (1993). Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 147-53.
- Picado, C. (2006). Mechanisms of aspirin sensitivity. *Curr Allergy Asthma Rep*, 6, 198-202.
- Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B. & Neufer, P. D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E806-14.
- Plante, H., Picard, S., Mancini, J. A. & Borgeat, P. (2006). 5-Lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem J*, 393, 211-8.

- Popescu, F. D. (2003). New asthma drugs acting on gene expression. *J Cell Mol Med*, 7, 475-86.
- Pouliot, M., McDonald, P. P., Borgeat, P. & McColl, S. R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med*, 179, 1225-32.
- Powers, S. K., Lennon, S. L., Quindry, J. & Mehta, J. L. (2002). Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol*, 17, 495-502.
- Radmark, O. & Samuelsson, B. (2005). Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 102-10.
- Radmark, O. P. (2000). The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, S11-5.
- Reddy, K. V., Serio, K. J., Hodulik, C. R. & Bigby, T. D. (2003). 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. *J Biol Chem*, 278, 13810-8.
- Rhind, S. G., Shek, P. N., Shinkai, S. & Shephard, R. J. (1996). Effects of moderate endurance exercise and training on in vitro lymphocyte proliferation, interleukin-2 (IL-2) production, and IL-2 receptor expression. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 74, 348-60.
- Rokitzki, L., Logemann, E. & Keul, J. (1994). Interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and malon-dialdehyde concentration during a marathon-run. *Int J Sports Med*, 15, 360.
- Rose-John, S., Schoolnik, H., Lenz, D., Hipp, E., Dufhues, G., Schmitz, H., Schiel, X., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C. (1990). Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor. *Eur J Biochem*, 190, 79-83.
- Rundell, K. W., Im, J., Mayers, L. B., Wilber, R. L., Szmedra, L. & Schmitz, H. R. (2001). Self-reported symptoms and exercise-induced asthma in the elite athlete. *Med Sci Sports Exerc*, 33, 208-13.
- Rundell, K. W. & Jenkinson, D. M. (2002). Exercise-induced bronchospasm in the elite athlete. *Sports Med*, 32, 583-600.
- Rundell, K. W., Wilber, R. L., Szmedra, L., Jenkinson, D. M., Mayers, L. B. & Im, J. (2000). Exercise-induced asthma screening of elite athletes: field versus laboratory exercise challenge. *Med Sci Sports Exerc*, 32, 309-16.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, 19, 568-74.

- Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Ormiston, T. M. & Salpeter, E. E. (2006). Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med*, 144, 904-12.
- Sarau, H., Ames, R., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J., Schmidt, D., Muccitelli, R., Jenkins, O., Murdock, P., Herrity, N., Halsey, W., Sathe, G., Muir, A., Nuthulaganti, P., Dytko, G., Buckley, P., Wilson, S., Bergsma, D. & Hay, D. (1999). Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol.*, 56, 657-63.
- Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messenger in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, 10, 2247-58.
- Sehmi, R., Cromwell, O., Wardlaw, A. J., Moqbel, R. & Kay, A. B. (1993). Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 23.
- Sheffer, A. L., Bousquet, J., Busse, W. W., Clark, T. J., Dahl, T., Evans, D., Fabbri, L. M., Hargreave, F. E. & Holgate, S. T. (1992). International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. *Eur Respir J*, 5, 601-41.
- Shephard, R. J., Rhind, S. & Shek, P. N. (1994). Exercise and the immune system. Natural killer cells, interleukins and related responses. *Sports Med*, 18, 340-69.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, R. (1994). Structure, regulation and function of NF-kB. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 405-55.
- Silverman, E., In, K. H., Yandava, C. & Drazen, J. M. (1998). Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase pathway in asthma. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 5, 164-70; discussion 71-3.
- Silverman, E. S. & Drazen, J. M. (2000). Genetic variations in the 5-lipoxygenase core promoter. Description and functional implications. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, S77-80.
- Spanbroek, R., Hildner, M., Steinhilber, D., Fusenig, N., Yoneda, K., Radmark, O., Samuelsson, B. & Habenicht, A. J. (2000). 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood*, 96, 3857-65.
- Spector, S. L. (1993). Update on exercise-induced asthma. *Ann Allergy*, 71, 571-7.
- Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. & Pedersen, B. K. (2003). Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *Faseb J*, 17, 884-6.
- Starkie, R. L., Rolland, J., Angus, D. J., Anderson, M. J. & Febbraio, M. A. (2001). Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C769-74.

- Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Moller, K. & Pedersen, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E433-7.
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A. & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E1272-8.
- Stegmann, H., Kindermann, W. & Schnabel, A. (1981). Lactate Kinetics and individual anaerobic threshold. *Int. J. Sports Medicine*, 2, 160-5.
- Stein, B. & Baldwin, A. (1993). Distinct mechanisms for the regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kB. *Mol Cell Biol*, 13, 7191-8.
- Stein, B., Baldwin, A. S., Ballard, D. W., Green, W. C., Angel, P. & Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF-kB p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J*, 12, 3879-91.
- Steinacker, J. M., Lormes, W., Reissnecker, S. & Liu, Y. (2004). New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol*, 91, 382-91.
- Steinhilber, D. (1994). 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm Acta Helv*, 69, 3-14.
- Storms, W. W. (1999). Exercise-induced asthma: diagnosis and treatment for the recreational or elite athlete. *Med Sci Sports Exerc*, 31, S33-8.
- Storms, W. W. (2003). Review of exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc*, 35, 1464-70.
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Totsuka, M., Sato, K. & Sugawara, K. (2002). Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev*, 8, 6-48.
- Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S., Okamura, N., Yamaya, K., Liu, Q., Kudoh, S., Kowatari, K., Nakaji, S. & Sugawara, K. (2000). Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*, 81, 281-7.
- Tahan, F., Karaaslan, C., Aslan, A., Kiper, N. & Kalayci, O. (2006). The role of chemokines in exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 96, 819-25.
- Tan, R. A. & Spector, S. L. (1998). Exercise-induced asthma. *Sports Med*, 25, 1-6.
- Thomas, S. J., Cooney, T. E. & Thomas, D. J. (2000). Comparison of exertional indices following moderate training in collegiate athletes. *J Sports Med Phys Fitness*, 40, 156-61.
- Tilg, H., Dinarello, C. A. & Mier, J. W. (1997). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83, 113-8.

- Tonnesen, E., Christensen, N. J. & Brinklov, M. M. (1987). Natural killer cell activity during cortisol and adrenaline infusion in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest*, 17, 497-503.
- Tunstall, R. J., Mehan, K. A., Wadley, G. D., Collier, G. R., Bonen, A., Hargreaves, M. & Cameron-Smith, D. (2002). Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E66-72.
- Ullum, H., Haahr, P. M., Diamant, M., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J. & Pedersen, B. K. (1994). Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol*, 77, 93-7.
- Ullum, H., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J., Diamant, M., Klokke, M., Kruuse, A., LaPerriere, A. & Pedersen, B. K. (1994). The effect of acute exercise on lymphocyte subsets, natural killer cells, proliferative responses, and cytokines in HIV-seropositive persons. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7, 1122-33.
- Umetsu, D. & DeKruyff, R. (1999). Interleukin-10: the missing link in asthma regulation? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21, 562-3.
- Vargaffing, B. B. & Singer, M. (2003). Leukotrienes, IL-13, and Chemokines cooperate to induce BHR and mucus in allergic mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284, L260-9.
- Vickers, P. J. (1995). 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Lipid Mediat Cell Signal*, 12, 185-94.
- Villaran, C., O'Neill, S. J., Helbling, A., van Noord, J. A., Lee, T. H., Chuchalin, A. G., Langley, S. J., Gunawardena, K. A., Suskovic, S., Laurenzi, M., Jasan, J., Menten, J. & Leff, J. A. (1999). Montelukast versus salmeterol in patients with asthma and exercise-induced bronchoconstriction. Montelukast/Salmeterol Exercise Study Group. *J Allergy Clin Immunol*, 104, 547-53.
- Weicher, H. & Werle, E. (1991). Interactions between hormones and the immune system. *Int J Sports Med*, 12Suppl, S30-7.
- Weicker, H. & Werle, E. (1991). Interaction between hormones and the immune system. *Int J Sports Med*, 12 Suppl 1, S30-7.
- Weight, L. M., Alexander, D. & Jacobs, P. (1991). Strenuous exercise: analogous to the acute-phase response? *Clin Sci (Lond)*, 81, 677-83.
- Weiler, J. M. (1996). Exercise-induced asthma: a practical guide to definitions, diagnosis, prevalence, and treatment. *Allergy Asthma Proc*, 17, 315-25.
- Weinstock, C., Konig, D., Harnischmacher, R., Keul, J., Berg, A. & Northoff, H. (1997). Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. *Med Sci Sports Exerc*, 29, 345-54.

- Weiss, C., Bierhaus, A. & Kinscherf, R. (2002). Tissue factor-dependent pathway is not involved in exercise-induced formation of thrombin and fibrin. *J Appl Physiol*, 92, 211-8.
- Werz, O. (2002). 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1, 23-44.
- Werz, O., Bürkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., Radmark, O. & Steinhilber, D. (2002). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *Faseb J*, 16, 1441-3.
- Werz, O., Bürkert, E., Samuelsson, B., Radmark, O. & Steinhilber, D. (2002). Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 99, 1044-52.
- Werz, O., Klemm, B., Samuelsson, B. & Radmark, O. (2000). 5-Lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5261-6.
- Werz, O., Klemm, J., Radmark, O. & Samuelsson, B. (2001). p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 830-8.
- Werz, O., Szellas, D., Steinhilber, D. & Radmark, O. (2002). Arachidonic Acid Promotes Phosphorylation of 5-Lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated Protein Kinase 2 (MK2). *J Biol Chem*, 277, 26.
- Whitney, A. R., Diehn, M., Popper, S. J., Alizadeh, A. A., Boldrick, J. C., Relman, D. A. & Brown, P. O. (2003). Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1896-901.
- Widgren, U., Jiang, X. J., Krook, A., Chibalin, A. V., Björnholm, M., Tally, M., Roth, R. A., Henriksson, J., Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J. R. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *Faseb J*, 12, 1379-89.
- Woods, J. W., Evans, J. F., Ethier, D., Scott, S., Vickers, P. J., Hearn, L., Heibein, J. A., Charleson, S. & Singer, II. (1993). 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med*, 178, 1935-46.
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*, 21, 425-56.
- Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T. & Shimizu, T. (2000). A second leukotriene B4 receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med*, 192, 421-32.
- Yu, M., Blomstrand, E., Chibalin, A. V., Krook, A. & Zierath, J. R. (2001). Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *J Physiol*, 536, 271-82.

- Yu, M., Stepto, N. K., Chibalin, A. V., Fryer, L. G., Carling, D., Krook, A., Hawley, J. A. & Zierath, J. R. (2003). Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *J Physiol*, 546, 327-35.
- Zambon, A. C., McDearmon, E. L., Salomonis, N., Vranizan, K. M., Johansen, K. L., Adey, D., Takahashi, J. S., Schambelan, M. & Conklin, B. R. (2003). Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. *Genome Biol*, 4, R61.
- Zieker, D., Fehrenbach, E., Dietzsch, J., Fliegner, J., Waidmann, M., Nieselt, K., Gebicke-Haerter, P., Spanagel, R., Simon, P., Niess, A. M. & Northoff, H. (2005). cDNA microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol Genomics*, 23, 287-94.
- Zieker, D., Zieker, J., Dietzsch, J., Burnet, M., Northoff, H. & Fehrenbach, E. (2005). CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. *Exerc Immunol Rev*, 11, 86-96.

8 Anhang

Tabelle 15: Einzelwerte der anthropometrischen Daten (Gruppe 1=trainiert, 2=untrainiert)

Prb-nr.	Geburts-datum	Untersuchungs-datum	Alter [Jahre]	Gruppe	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Körperfett [%]
1	07.04.78	21.06.05	27	2	180	64	11,6
4	11.02.76	01.07.05	29	2	178	72	13,0
6	07.08.80	15.07.05	24	2	173	56	11,6
7	25.03.82	18.07.05	23	2	179	68	15,2
8	23.03.85	18.07.05	20	2	177	72	13,2
9	13.06.77	02.08.05	28	2	177	66	19,3
10	04.01.84	09.08.05	21	2	185	93	24,1
11	07.10.75	10.08.05	29	2	188	100	25,1
12	17.12.82	11.08.05	22	2	172	70	12,3
13	17.01.83	18.08.05	22	2	185	82,5	14,9
14	21.06.78	22.08.05	27	2	187	80,5	15,6
15	09.05.69	01.09.05	36	2	176	76	12,4
16	28.05.78	12.09.05	27	2	186	72	11,4
17	09.12.81	13.09.05	23	2	170	75	20,5
18	07.12.78	15.09.05	26	2	197	103	20,0
19	07.02.85	05.10.05	20	2	185	107	21,9
20	08.11.79	06.10.05	25	2	174	64	22,4
21	05.02.78	23.06.05	27	1	174	63	5,4
22	12.08.75	29.06.05	29	1	180	72	8,1
23	16.11.81	30.06.05	23	1	171	60	3,5
24	13.02.84	01.07.05	21	1	183	73	10,6
25	04.10.82	06.07.05	22	1	174	64	6,6
26	21.02.79	07.07.05	26	1	177	65,5	10,8
27	22.08.82	07.07.05	22	1	186	72	8,1
29	23.04.83	08.07.05	22	1	186	85	11,0
30	15.04.79	19.07.05	26	1	183	71	9,4
31	10.09.73	20.07.05	31	1	187	87	5,1
32	29.01.85	21.07.05	20	1	174	66	10,4
33	03.09.70	22.07.05	34	1	186	81	10,6
34	18.01.69	22.07.05	36	1	187	80,2	8,2
35	16.12.82	25.07.05	22	1	180	75	7,4
36	21.03.83	25.07.05	22	1	176	65	5,4
37	02.10.84	27.07.05	20	1	168	49	3,5
38	28.05.82	10.08.05	23	1	186	73	12,7
39	09.07.87	18.08.05	18	1	193	75	11,4
40	24.06.82	02.09.05	23	1	188	83	11,4
41	09.03.85	02.09.05	20	1	178	75	5,4

Anhang

Tabelle 16: Einzelwerte der Leistungsdaten (Herzvolumen (Herzvol.), maximale Sauerstoffaufnahme (VO₂max), maximale und realtive Leitsung (Pmax und Prel) und IAS)

Prb-nr.	Herzvol. [ml]	rel. Herzvol. [ml/kg]	VO ₂ max [ml/min]	VO ₂ max/kg [ml/min/kg]	Pmax [Watt]	Prel [Watt/kg]	IAS [Watt]
1	666	10,2	2681	41,9	217	3,4	110
4	872	12,1	3634	50,5	283	3,9	210
6	627	11,2	2842	50,8	213	3,8	81
7	738	10,9	2867	42,2	200	2,9	129
8	731	10,2	3583	49,8	267	3,7	120
9	805	10,2	2959	44,8	200	3,0	105
10	1032	11,1	4684	50,4	350	3,8	237
11	1123	11,2	4201	42,0	317	3,2	200
12			3518	50,3	267	3,8	137
13	939	11,4	3902	47,3	300	3,6	224
14	884	11,0	3963	49,2	300	3,7	220
15	691	9,1	3645	48,0	267	3,5	145
16	879	12,2	3170	44,0	250	3,5	171
17	870	11,6	3582	47,8	250	3,3	182
18	941	9,1	4641	45,1	350	3,4	260
19	885	8,3	4089	38,2	283	2,6	188
20	992	11,9	3709	44,6	267	3,2	147
21	837	13,3	4085	64,8	300	4,8	217
22	981	13,6	4708	65,4	392	5,4	313
23	924	15,9	4134	68,9	317	5,3	208
24	856	11,7	4687	64,2	417	5,7	317
25			4353	68,0	350	5,5	242
26	803	12,3	5135	78,4	383	5,9	287
27	837	11,6	4824	67,0	333	4,6	266
29	1160	13,6	5871	69,1	450	5,3	339
30	995	14,0	4651	65,5	383	5,4	296
31	1109	12,7	5685	65,3	458	5,3	360
32	845	12,8	4460	67,6	333	5,1	225
33	1020,6	12,6	5197	64,2	350	4,3	294
34	1197	14,9	5694	71,0	450	5,6	364
35	793	10,6	4927	65,7	383	5,1	281
36	761	11,7	4239	65,2	300	4,6	127
37	695	14,2	3896	79,5	325	6,6	221
38	1038	14,2	4947	67,8	400	5,5	276
39	918	12,2	4983	66,4	379	5,1	283
40	985	11,9	5409	65,2	429	5,2	310
41	1073	14,3	5721	76,3	417	5,6	287

Anhang

Tabelle 17: Einzelwerte aus dem Dauertest (Gruppe 1=trainiert, 2=untrainiert)

Prb- nr.	Gruppe	IAS 80% [Watt]	Fahrzeit [min]	Gewicht vor [kg]	Gewicht nach [kg]	Gewichts- differenz	BORG
1	2	88	90	64,5	64	-0,5	15
4	2	168	90	71,2	70,3	-0,9	12
6	2	65	90	57,5	57,1	-0,4	13
7	2	103	90	67,8	67,4	-0,4	13
8	2	96	90	72,1	71	-1,1	13
9	2	84	90	63,5	63,1	-0,4	13
10	2	190	90	97,4	96,1	-1,3	17
11	2	160	90	102,6	102,4	-0,2	13
12	2	110	90	68	67,2	-0,8	12
13	2	179	90	80	79,4	-0,6	15
14	2	176	90	80,6	79,4	-1,2	16
15	2	116	90	76,5	75,6	-0,9	16
16	2	137	90	70,8	71	0,2	18
17	2	146	90	73,4	73	-0,4	14
18	2	208	90	103,3	101,3	-2	18
19	2	150	90	107,7	106,4	-1,3	12
20	2	118	90	82,6	82	-0,6	12
21	1	174	90	64,6	64,2	-0,4	14
22	1	250	90	72,7	71,7	-1	15
23	1	166	90	58,3	57,4	-0,9	16
24	1	254	90	73,6	72	-1,6	13
25	1	194	90	65,1	63,8	-1,3	12
26	1	230	90	65,8	64,4	-1,4	15
27	1	213	88	71,8	71,2	-0,6	19
29	1	271	90	86	84,6	-1,4	13
30	1	237	90	71,8	69,8	-2	16
31	1	288	90	87	85,2	-1,8	16
32	1	180	90	65,5	65	-0,5	12
33	1	235	90	81,8	80,3	-1,5	15
34	1	291	90	81,3	79,6	-1,7	14
35	1	225	90	75,6	75,6	0	15
36	1	102	90	64,6	63,8	-0,8	10
37	1	177	90	48,7	48	-0,7	13
38	1	221	90	75,2	73,4	-1,8	14
39	1	226	90	75,1	74	-1,1	15
40	1	248	90	83,1	81	-2,1	13
41	1	230	90	75,4	74,2	-1,2	15

Anhang

Tabelle 18: Einzelwerte der Herzfrequenzen (HF) in Schlägen/min während des Dauertests

Probandennr.	HF 0'	HF 20'	HF 40'	HF 60'	HF 80'	HF 90'
1	89	122	128	130	136	135
4	72	150	154	158	161	166
6	50	117	128	135	137	149
7	75	156	150	157	157	158
8	82	129	135	125	128	130
9	75	104	117	119	133	138
10	86	159	163	170	172	176
11	62	135	141	151	150	152
12	63	124	135	145	149	150
13	76	160	174	168	159	162
14	55	140	146	158	163	167
15	69	124	139	144	145	147
16	78	144	146	143	146	148
17	80	161	159	153	157	161
18	78	169	174	171	174	176
19	66	148	143	156	156	154
20	80	118	123	127	125	127
21	55	133	134	133	137	136
22	58	148	154	155	158	154
23	65	130	131	135	144	148
24	66	154	156	160	159	160
25	88	147	151	148	149	151
26	55	168	174	182	180	179
27	57	152	156	163	168	174
29	53	144	149	153	155	151
30	81	160	168	171	172	170
31	65	141	153	161	171	176
32	65	140	148	150	159	162
33	85	176	178	177	181	182
34	75	149	150	150	153	154
35	77	179	185	186	190	190
36	92	120	126	128	130	123
37	74	175	173	169	168	170
38	71	137	154	156	158	162
39	74	160	153	156	158	154
40	60	130	135	144	144	146
41	58	135	137	138	138	140

Anhang

Tabelle 19: Blutdruckwerte in mmHg während des Dauertests (RR=Blutdruck) (dia=diastolisch, sys=systolisch)

Prb- nr.	RR sys 0'	RR dia 0'	RR sys 20'	RR dia 20'	RR sys 40'	RR dia 40'	RR sys 60'	RR dia 60'	RR sys 80'	RR dia 80'	RR sys 90'	RR dia 90'
1	128	82	160	75	155	75	150	75	145	70	145	65
4	130	70	140	60	140	60	145	60	145	60	155	70
6	100	70	140	55	135	60	130	55	125	55	130	50
7	110	80	140	70	130	60	140	60	136	60	130	60
8	120	90	150	90	150	90	160	86	160	80	160	80
9	110	79	124	80	115	80	130	80	140	75	140	75
10	120	80	150	80	130	80	130	80	140	80	130	80
11	122	80	150	80	158	80	160	75	160	75	150	80
12	120	76	130	82	140	80	150	80	140	80	160	79
13	120	80	150	70	180	70	170	70	120	70	130	70
14	116	90	140	70	150	70	130	60	140	70	120	60
15	110	90	130	80	140	80	140	80	140	90	130	90
16	110	70	160	60	150	70	150	60	140	60	140	60
17	110	80	160	60	160	70	170	60	170	50	170	50
18	120	90	140	80	140	70	130	70	140	60	150	80
19	130	80	140	70	150	80	150	70	160	70	150	80
20	120	80	140	70	130	70	130	70	130	80	136	70
21	160	65	160	70	145	60	130	65	135	65	140	65
22	130	80	185	50	185	50	175	50	160	60	165	65
23	120	65	155	70	185	65	195	60	185	65	195	70
24	140	70	145	60	135	60	140	55	145	55	135	45
25	130	65	180	55	160	55	170	60	165	55	165	55
26	120	86	170	50	180	70	180	50	160	60	170	50
27	124	80	170	50	160	40	140	40	160	50	160	60
29	130	80	180	65	160	65	160	60	155	60	160	60
30	120	84	170	50	156	50	160	50	140	50	130	50
31	140	90	240	60	210	60	220	60	210	60	220	50
32	110	80	140	70	170	70	150	70	150	70	160	70
33	120	80	200	60	180	70	180	70	170	70	178	70
34	126	84	180	70	180	70	190	60	170	70	170	70
35	106	90	160	80	165	85	150	85	145	85	141	80
36	120	80	160	80	135	80	150	80	160	80	140	80
37	104	70	120	60	130	60	110	50	120	60	160	50
38	142	80	160	80	170	75	162	75	160	75	150	75
39	115	70	130	70	160	60	160	60	160	65	170	60
40	130	70	140	75	152	70	156	68	158	68	158	65
41	130	80	150	60	160	60	160	60	160	55	160	60

Anhang

Tabelle 20: Laktatwerte (Lac) in mmol/l während des Dauertests

Probandennr.	Lac 0'	Lac 20'	Lac 40'	Lac 60'	Lac 80'	Lac 90'
1	1,11	2,05	1,85	2,1	1,88	1,78
4	0,78	1,82	1,47	1,44	1,39	1,34
6	1,33	2,48	1,76	1,35	1,41	1,78
7	1,47	5,63	3,03	2,65	3,62	2,84
8	1,1	4,54	2,59	2,28	1,86	1,75
9	1,07	2,54	2,15	2,1	1,91	1,67
10	1,29	4,27	4,23	4,15	2,7	2,76
11	1,41	2,13	2,19	2,51	2,17	2,58
12	1,45	3,79	2,25	2,03	1,92	2,02
13	0,73	6,79	6,03	2,58	1,71	2,44
14	0,8	4,42	3,47	3,06	4,1	3,97
15	1,78	2,29	1,95	2,2	2,06	1,56
16	1,6	4,04	3,45	2,82	2,93	4,04
17	1,12	2,7	2,52	2,42	2,4	1,96
18	1,52	6,11	5,81	4,28	3,96	4
19	0,98	2,91	1,66	2,14	1,85	1,64
20	0,99	2,13	1,34	1,58	1,38	1,72
21	0,93	1,64	1,36	1,21	1,23	1,33
22	0,73	2,21	1,86	2,26	2,37	1,84
23	1,4	1,5	1,65	2,02	1,8	1,91
24	1,28	2,69	2,05	1,87	1,69	1,87
25	1,36	2,93	2,82	2,45	2,06	2,01
26	1,56	1,39	1,71	1,83	2,28	1,58
27	1,06	2,15	2,29	2,62	3,06	4,65
29	1,21	1,63	1,79	2,02	1,92	2,53
30	1,56	3,15	2,38	3,2	2,27	2,47
31	1,46	2,25	1,47	1,91	2,13	2,39
32	0,95	1,51	2,06	2,02	1,48	1,48
33	1,28	3,51	2,27	2,09	1,88	1,95
34	1,76	1,95	2,36	1,82	1,65	1,54
35	1,41	4,21	4,91	4,71	4,62	4,48
36	0,98	1,57	1,92	1,76	1,75	1,19
37	1,41	2,11	1,74	1,82	1,19	1,18
38	1,7	1,84	2,61	2,15	2,32	2,38
39	0,68	2,24	1,9	2,01	1,56	1,55
40	1,79	2,06	2,5	2,78	2,85	2,76
41	1,68	2,44	2,7	2,71	2,5	2,64

Anhang

Tabelle 21: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt A (Ruhe)

Probandennr.	Leukozyten [x10 ⁹ /l]	Erythrozyten [x10 ⁹ /l]	Hämoglobin [mmol/l]	Hämatokrit [l/l]	Thrombozyten [x10 ⁹ /l]
1	4,3	4,64	8,2	0,402	259
4	7,3	5,26	9	0,479	267
6	5,5	5,41	8,9	0,47	189
7	4,6	5,4	9,3	0,463	287
8	4,2	5,1	9,4	0,489	179
9	5,1	5,11	9,2	0,472	286
10	5,2	5,35	9,7	0,468	202
11	7,6	5,72	10,5	0,522	287
12	5,7	5,3	10	0,476	234
13	4,6	5,35	9,8	0,479	221
14	4,1	4,71	8,6	0,413	203
15	5,4	5,34	9,6	0,468	197
16	5	5,36	9	0,46	181
17	5	5,24	9,8	0,473	201
18	5	5,3	9,6	0,487	154
19	6,1	5,82	10,3	0,51	298
20	6,1	5,42	9,7	0,452	271
21	5,4	4,87	9,6	0,469	279
22	3,4	4,63	8,3	0,437	277
23	4,7	5,05	9,2	0,451	226
24	3,5	4,6	8,7	0,446	214
25	3,8	4,74	8,8	0,439	186
26	4,6	5,06	9,4	0,477	163
27	6,4	5,48	9,7	0,473	259
29	6,2	5,21	9,9	0,491	195
30	4	5,1	9,6	0,47	212
31	4	4,47	8,8	0,43	301
32	3,6	5,72	10,4	0,511	195
33	3,8	5,28	9,6	0,469	153
34	5,9	4,59	8,8	0,435	185
35	4,8	5,39	10,3	0,478	209
36	5,3	5,08	10,3	0,514	331
37	4,2	5,02	9,3	0,456	266
38	5,2	4,74	9,4	0,456	278
39	3,8	5,05	9,4	0,466	182
40	5,5	5,15	9,2	0,466	232
41	4,1	5,24	9,5	0,483	225

Anhang

Tabelle 22: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt A (Ruhe)

Probandennr.	Lymphozyten [%]	Lymphozyten [x10 ⁹ /l]	Monozyten [%]	Monozyten [x10 ⁹ /l]	Granulozyten [%]	Granuloz. [x10 ⁹ /l]
1	44	1,9	8	0,3	48	2,1
4	31	2,3	2	0,1	67	4,9
6	42	2,3	4	0,2	54	3
7	40	1,8	10	0,5	51	2,3
8	40	1,7	10	0,4	50	2,1
9	32	1,6	5	0,2	64	3,2
10	32	1,6	11	0,6	57	3
11	25	1,9	6	0,4	69	5,2
12	36	2,1	9	0,5	55	3,2
13	36	1,7	11	0,5	53	2,4
14	39	1,6	8	0,3	53	2,2
15	30	1,6	6	0,3	65	3,5
16	39	1,9	6	0,6	56	2,8
17	35	1,8	9	0,4	56	2,8
18	34	1,7	3	0,2	63	3,1
19	35	2,1	12	0,7	54	3,3
20	29	1,7	6	0,4	66	4
21	41	2,2	6	0,3	53	2,9
22	36	1,2	5	0,2	59	2
23	33	1,6	8	0,4	59	2,8
24	36	1,3	7	0,2	57	2
25	37	1,4	7	0,3	57	2,1
26	30	1,4	6	0,3	64	2,9
27	32	2,1	8	0,5	60	3,8
29	30	1,8	4	0,3	66	4,1
30	37	1,5	11	0,4	52	2,1
31	39	1,6	9	0,4	52	2,1
32	42	1,5	2	0,1	56	2
33	29	1,1	9	0,3	62	2,4
34	35	2	8	0,4	58	3,4
35	34	1,6	12	0,6	53	2,6
36	42	2,2	7	0,4	51	2,7
37	34	1,4	8	0,3	58	2,4
38	30	1,6	8	0,4	62	3,2
39	35	1,3	8	0,3	56	2,1
40	21	1,1	8	0,4	71	3,9
41	38	1,6	5	0,2	57	2,3

Anhang

Tabelle 23: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt B (Ende der Belastung)

Probandennr.	Leukozyten [x10 ⁹ /l]	Erythrozyten [x10 ⁹ /l]	Hämoglobin [mmol/l]	Hämatokrit [l/l]	Thrombozyten [x10 ⁹ /l]
1	6,1	4,72	8,2	0,42	296
4	10,6	5,71	9,8	0,513	348
6	11,3	5,6	9,3	0,485	227
7	7,1	5,41	9,2	0,466	321
8	7	5,44	9,9	0,514	242
9	9,5	5,51	10,1	0,51	300
10	10	5,62	9,9	0,491	344
11	8,6	5,84	10,6	0,529	309
12	12,3	5,48	10,1	0,495	279
13	9,9	5,57	9,9	0,5	310
14	8,4	5,17	9,4	0,458	302
15	6,7	5,55	9,6	0,483	249
16	9	5,79	9,3	0,497	259
17	7,1	5,35	9,8	0,49	290
18	8,5	6,12	11,2	0,564	218
19	8,8	6,15	10,5	0,538	395
20	7	5,44	9,4	0,473	329
21	9,3	5,25	10,3	0,518	342
22	8,7	5,13	9,3	0,475	395
23	5,8	5,58	9,8	0,504	309
24	6,4	4,76	8,8	0,465	304
25	9,7	5,08	9,3	0,475	182
26	8	5,56	10,6	0,527	249
27	16,2	5,81	10,3	0,505	352
29	9,6	5,45	10,2	0,507	210
30	7,3	5,77	10,8	0,536	298
31	6,9	4,99	9,6	0,481	402
32	6,7	6,08	11	0,549	391
33	8	5,75	10,3	0,514	242
34	8,7	4,94	9,5	0,464	233
35	9,8	5,87	11	0,529	310
36	7,7	5,17	10,3	0,524	442
37	5,2	5,32	9,6	0,492	334
38	7,4	5,29	10,2	0,505	400
39	8,9	5,06	9,1	0,465	241
40	9,1	5,35	9,4	0,477	316
41	7,1	5,7	10,4	0,533	305

Anhang

Tabelle 24: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt B (Ende der Belastung)

Probandennr.	Lymphozyten [%]	Lymphozyten [x10 ⁹ /l]	Monozyten [%]	Monozyten [x10 ⁹ /l]	Granulozyten [%]	Granuloz. [x10 ⁹ /l]
1	48	2,9	3	0,2	50	3
4	26	2,7	2	0,2	72	7,7
6	18	2,1	4	0,4	78	8,8
7	27	1,9	7	0,5	66	4,7
8	38	2,7	6	0,4	56	3,9
9	24	2,3	5	0,5	71	6,8
10	29	2,9	8	0,8	64	6,4
11	28	2,4	2	0,2	70	6
12	28	3,4	7	0,9	65	8
13	33	3,2	7	0,6	61	6
14	33	2,8	7	0,6	60	5
15	36	2,4	5	0,4	59	4
16	40	3,6	2	0,2	58	5,2
17	42	3	6	0,4	52	3,7
18	39	3,3	6	0,5	54	4,6
19	34	3	7	0,6	59	5,2
20	31	2,2	2	0,2	67	4,7
21	34	3,1	4	0,4	62	5,8
22	25	2,1	4	0,4	71	6,2
23	36	2,1	5	0,3	59	3,4
24	33	2,1	3	0,2	64	4,1
25	14	1,3	2	0,2	85	8,2
26	34	2,7	5	0,4	61	4,9
27	30	4,9	7	1,1	63	10,2
29	23	2,2	4	0,3	73	7
30	37	2,7	8	0,6	55	4
31	35	2,4	4	0,3	61	4,2
32	34	2,3	4	0,3	62	4,1
33	20	1,6	5	0,4	76	6
34	35	3	7	0,6	58	5,1
35	45	4,4	6	0,6	49	4,8
36	37	2,8	3	0,3	60	4,6
37	39	2	5	0,3	56	2,9
38	31	2,3	6	0,4	64	4,7
39	27	2,4	4	0,4	69	6,1
40	23	2,1	3	0,3	74	6,7
41	26	1,9	4	0,3	70	4,9

Anhang

Tabelle 25: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt C (45' nach Ende der Belastung)

Probandennr.	Leukozyten [x10 ⁹ /l]	Erythrozyten [x10 ⁹ /l]	Hämoglobin [mmol/l]	Hämatokrit [l/l]	Thrombozyten [x10 ⁹ /l]
1	7,3	7,8	7,8	0,401	268
4	15,8	5,27	9,1	0,469	290
6	10,7	5,36	8,9	0,466	194
7	8,2	5,24	9,3	0,455	285
8	7,9	4,84	8,8	0,459	172
9	11,1	5,11	9,4	0,471	274
10	11,6	5,3	9,3	0,462	233
11	10,2	5,82	10,7	0,518	291
12	15,2	5,22	9,5	0,465	228
13	14,9	5,23	9,4	0,463	227
14	11,8	4,91	8,8	0,435	205
15	8,3	5,2	9,1	0,453	201
16	8,1	5,2	8,4	0,448	213
17	5,6	5,09	9,3	0,471	211
18	7,9	5,58	10,1	0,521	166
19	10,2	5,84	9,9	0,512	312
20	8	5,35	9,3	0,462	289
21	12,3	5,09	10	0,495	296
22	10,3	4,79	8,6	0,452	297
23	6,4	5,21	9,2	0,472	237
24	7,4	4,78	9	0,46	239
25	7,7	5,42	9,9	0,499	223
26	11,9	5,31	10,1	0,505	178
27	16	5,54	9,7	0,48	262
29	10,2	5,37	9,9	0,503	209
30	6,2	5,34	9,8	0,492	209
31	9,6	4,51	8,9	0,436	299
32	6,2	5,71	10,3	0,519	201
33	6,6	5,47	9,7	0,48	176
34	7,5	4,63	8,7	0,434	182
35	8,3	5,7	10,5	0,519	225
36	8	5,15	10,2	0,518	358
37	5,6	5,16	9,3	0,477	258
38	5,8	4,88	9,4	0,466	301
39	11,5	4,91	9	0,448	181
40	7,9	5,09	8,8	0,458	242
41	10,3	5,34	9,7	0,488	233

Anhang

Tabelle 26: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt C (45' nach Ende der Belastung)

Probandennr.	Lymphozyten [%]	Lymphozyten [x10 ⁹ /l]	Monozyten [%]	Monozyten [x10 ⁹ /l]	Granulozyten [%]	Granuloz. [x10 ⁹ /l]
1	33	2,4	1	0,1	66	4,8
4	16	2,5	3	0,4	81	12,9
6	16	1,7	3	0,3	82	8,7
7	25	2,1	6	0,5	69	5,6
8	28	2,2	7	0,6	65	5,1
9	16	1,8	4	0,4	80	8,9
10	15	1,7	5	0,6	81	9,3
11	21	2,2	3	0,3	76	7,7
12	16	2,4	4	0,7	80	12,1
13	14	2,1	4	0,7	81	12,1
14	12	1,4	5	0,5	83	9,8
15	19	1,6	4	0,3	77	6,4
16	28	2,2	3	0,2	70	5,6
17	34	1,9	4	0,2	62	3,5
18	23	1,8	3	0,2	75	5,9
19	15	1,6	3	0,3	82	8,4
20	24	1,9	3	0,3	73	5,8
21	20	2,4	2	0,2	79	9,7
22	15	1,5	3	0,3	82	8,5
23	24	1,5	5	0,3	71	4,6
24	21	1,5	2	0,2	77	5,7
25	34	2,6	4	0,3	62	4,8
26	14	1,7	4	0,5	81	9,7
27	15	2,4	4	0,7	81	13
29	18	1,8	4	0,4	78	8
30	28	1,7	10	0,6	62	3,9
31	15	1,4	5	0,5	80	7,7
32	24	1,5	4	0,3	72	4,4
33	15	1	6	0,4	79	5,2
34	27	2	6	0,4	67	5
35	20	1,6	6	0,5	75	6,2
36	30	2,4	4	0,3	66	5,3
37	29	1,6	5	0,3	67	3,7
38	29	1,7	6	0,4	65	3,8
39	13	1,5	5	0,5	82	9,4
40	20	1,6	2	0,2	78	6,2
41	16	1,7	3	0,3	81	8,4

Anhang

Tabelle 27: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt D (2Stunden nach Ende der Belastung)

Probandennr.	Leukozyten [x10 ⁹ /l]	Erythrozyten [x10 ⁹ /l]	Hämoglobin [mmol/l]	Hämatokrit [l/l]	Thrombozyten [x10 ⁹ /l]
1	9,7	4,75	8,1	0,419	276
4	14,7	5,21	9	0,468	274
6	10	5,31	8,8	0,459	198
7	12,1	5,4	9,5	0,466	292
8	8,8	4,98	9,6	0,474	178
9	10,1	4,92	8,9	0,46	263
10	12,1	5,42	9,4	0,472	233
11	11,5	5,45	10	0,486	292
12	15	5,29	9,7	0,473	244
13	15,8	5,46	9,7	0,488	237
14	12,9	5,06	9	0,457	213
15	10,8	5,16	9,4	0,454	224
16	14,3	5,34	8,5	0,462	210
17	7,3	5,11	9,4	0,475	220
18	9,7	5,51	9,9	0,509	167
19	11,6	6,05	10,3	0,53	315
20	10	5,72	9,9	0,491	298
21	11,9	5,25	10,2	0,513	302
22	9,2	4,66	8,4	0,435	277
23	8,9	5,08	9,1	0,464	244
24	7,3	4,85	9	0,47	231
25					
26	14,2	5,29	10,1	0,493	186
27	16,9	5,77	10,2	0,508	266
29	10,9	5,28	9,8	0,497	181
30	8,4	5,44	10,1	0,51	233
31	10,1	4,45	8,6	0,429	293
32	6,7	5,69	10,2	0,512	206
33	9,1	5,51	9,8	0,495	157
34	9,1	4,5	8,6	0,425	180
35	11,4	5,74	10,3	0,52	234
36	9,9	5,22	10,3	0,522	343
37	8,6	5,21	9,3	0,481	263
38	7,4	4,81	9,3	0,461	284
39	11,7	5,06	9,3	0,464	168
40	7,8	4,94	8,5	0,437	252
41	10,6	5,34	9,6	0,492	224

Anhang

Tabelle 28: Immunzellen während des Dauertests zum Messzeitpunkt D (2Stunden nach Ende der Belastung)

Probandennr.	Lymphozyten [%]	Lymphozyten [x10 ⁹ /l]	Monozyten [%]	Monozyten [x10 ⁹ /l]	Granulozyten [%]	Granuloz. [x10 ⁹ /l]
1	28	2,7			71	6,9
4	18	2,6	2	0,4	80	5,21
6	18	1,8	2	0,2	80	8
7	21	2,5	7	0,9	72	8,7
8	25	2,2	9	0,8	67	5,9
9	16	1,6	2	0,2	82	8,3
10	14	1,7	4	0,5	82	9,9
11	21	2,4	3	0,4	76	8,7
12	19	2,8	4	0,6	78	11,6
13	15	2,4	2	0,3	83	13,1
14	11	1,4	4	0,5	84	10,9
15	19	2	6	0,6	76	8,2
16	18	2,5	2	0,3	80	11,5
17	31	2,2	3	0,2	66	4,8
18	18	1,8	2	0,2	80	7,7
19	16	1,9	2	0,2	82	9,5
20	23	2,3	3	0,3	74	7,4
21	23	2,8	2	0,2	75	8,9
22	15	1,4	2	0,2	83	7,7
23	17	1,5	1	0,1	82	7,3
24	19	1,4	1	0,1	80	5,8
25						
26	10	1,4	5	0,7	85	12,1
27	12	2	1	0,2	87	14,6
29	17	1,8	4	0,5	79	8,6
30	22	1,9	7	0,6	71	6
31	16	1,6	3	0,3	81	8,2
32	21	1,4	3	0,2	76	5,1
33	15	1,3	6	0,6	79	7,2
34	25	2,3	5	0,5	70	6,4
35	17	2	4	0,4	79	9
36	28	2,8	3	0,3	69	6,8
37	22	1,9	5	0,4	73	6,2
38	24	1,7	6	0,4	71	5,3
39	14	1,6	4	0,4	83	9,7
40	22	1,7	4	0,3	74	5,8
41	16	1,7	5	0,5	79	8,4

Anhang

Tabelle 29: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von ALOX5AP, ALOX5, CCL5 und CSF2 (GM-CSF); A=Ruhe, C=MZP 45' post

Nr	ALOX5AP_A	ALOX5AP_C	ALOX5_A	ALOX5_C	CCL5_A	CCL5_C	CSF2_A	CSF2_C
1	0,6032	1,0627	0,2792	0,3724	0,6010	-0,0560	-0,1920	0,3770
4	0,5125	1,3125	0,6092	0,7579	0,8337	-0,1787	-0,1996	0,0487
6	0,9593	2,1284	0,2036	0,4597	1,5357	0,0677	-0,4565	-0,2649
7	-0,1107	0,5536	0,6501	0,8760	0,1854	0,1833	0,1416	0,1024
8	-0,2528	0,3540	0,2896	1,6636	-0,1705	-0,4263	0,2466	-0,1820
9	0,3677	1,1697	1,1900	1,4085	0,5263	-0,3594	-0,1977	0,0290
10	0,4125	1,2099	0,8217	1,0411	1,1149	-0,2645	-0,1660	0,0282
11	0,7219	0,8561	1,6272	1,4036	0,7205	0,2544	-0,1131	-0,1888
12	-0,0835	0,6999	0,9213	1,5615	1,0286	-0,0173	-0,0365	0,3999
13	0,3456	1,5660	1,0231	1,8938	0,8044	-0,3470	-0,3182	0,2844
14	-0,0053	1,2974	1,0572	2,0844	0,6326	-0,5899	-0,3206	-0,0957
15	0,4063	1,1436	1,4485	1,8502	0,5683	0,2506	0,0463	-0,0100
16	0,0203	0,9377	0,8888	1,7504	0,8584	0,4307	-0,3880	0,0781
17	0,1599	0,5028	2,1869	2,1675	1,0575	1,1448	0,4138	0,2051
18	0,8039	1,0967	0,4400	1,2646	0,7989	0,2202	-0,3565	-0,1173
19	0,0544	0,8737	1,0921	1,1540	1,1215	-0,1896	0,0602	0,0376
20	0,0310	0,1459	0,9926	1,4108	0,2562	-0,0762	0,2746	0,2937
21	0,1134	1,0355	0,6819	0,7873	0,8277	-0,0619	-0,2201	0,4051
22	0,1709	1,0375	0,9846	1,7239	0,6208	-0,0558	-0,2492	-0,2635
23	0,1595	0,8520	1,1549	1,2732	0,4069	-0,0545	-0,0473	0,2196
24	0,3846	0,9125	0,7278	0,8997	0,8767	0,0951	0,1870	0,3028
25	0,4166	1,3542	0,7385	0,9467	1,0938	0,1287	0,0801	0,3086
26	0,6654	1,2830	1,3875	1,1664	1,0606	0,1069	0,0069	-0,0174
27	0,5039	0,5800	1,3223	1,0324	0,8401	-1,1083	0,1448	0,0642
29	0,2395	1,0114	1,1549	1,0135	0,3817	0,2401	-0,0558	0,0178
30	0,0139	0,4448	0,6713	0,4144	0,6167	-0,0603	-0,0867	0,0797
31	-0,2413	0,5114	0,6872	0,8142	0,2852	-0,7487	-0,3757	0,0319
32	0,0091	0,6416	0,9049	1,1982	1,0550	0,1107	-0,2585	0,0966
33	0,3648	1,2877	0,3853	1,0251	0,6949	-0,0500	-0,0923	-0,0541
34	0,2222	0,2541	0,6723	1,2518	0,4670	-0,2501	0,3130	0,7482
35	0,1147	0,9391	1,1435	1,5787	0,1843	-0,5624	0,0567	0,1847
36	0,1007	0,2481	1,2923	1,5656	0,8331	0,3939	-0,0043	0,1141
37	-0,2690	1,1891	0,5782	1,2460	0,1828	1,2096	-0,1466	-0,2138
38	0,2207	0,4769	0,8582	1,0909	0,6399	0,4487	-0,1041	0,1154
39	0,4073	1,4091	1,1222	1,4152	1,2321	-0,5660	-0,1541	0,5513
40	0,5073	0,6168	1,5076	1,0364	0,2886	-0,1181	0,1774	0,0832
41	0,0586	0,8992	1,1502	0,7451	0,1953	-0,8859	0,0307	0,0856

Anhang

Tabelle 30: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von Histamin-Rezeptor H1 (HRH1), Prostaglandinsynthase 1 und 2 (PTGS1/2) und Thromboxan Synthase 1 (TBXAS1); A=Ruhe, C=MZP 45'post

Nr	HRH1_A	HRH1_C	PTGS1_A	PTGS1_C	PTGS2_A	PTGS2_C	TBXAS1_A	TBXAS1_C
1	-0,474	-0,426	0,258	0,300	0,758	0,805	0,357	0,385
4	-0,566	-0,306	-0,193	-0,219	0,263	0,965	0,645	0,665
6	-0,669		-0,102	-0,141	0,711	0,747	0,939	0,201
7	-0,097	-0,409	-0,112	-0,444	0,309	0,421	0,181	0,266
8	-0,512	-0,567	-0,233	0,046	0,275	1,142	0,367	0,863
9	-0,388	-0,356	0,005	-0,155	0,998	0,980	1,265	0,746
10	-0,674	-0,445	0,029	-0,457	0,908	0,705	0,837	0,914
11	-0,477	-0,493	-0,076	-0,151	1,670	1,094	1,092	0,591
12	-0,798	-0,484	0,152	-0,149	0,622	0,881	0,861	1,025
13	-0,766	-0,670	-0,128	-0,094	0,754	1,240	1,021	0,801
14	-0,578	-0,729	-0,016	-0,379	0,825	1,513	0,880	0,927
15	-0,406	-0,734	0,293	0,105	1,281	1,601	1,063	0,858
16	-0,519	-0,641	0,252	-0,253	1,081	1,239	1,035	0,999
17	-0,745	-0,605	0,403	0,386	0,676	1,045	0,850	0,724
18	-0,511	-0,440	0,188	-0,087	1,140	0,879	1,126	0,709
19	-0,881	-0,639	-0,202	-0,421	0,815	1,493	1,332	1,159
20	-0,531	-0,578	-0,299	-0,092	1,175	1,334	1,110	1,027
21	-0,835	-0,572	0,056	-0,850	0,971	1,822	0,923	0,463
22	-0,866	-0,512	-0,333	-0,300	0,635	1,596	1,326	1,212
23	-0,691	-0,603	-0,307	-0,082	0,429	1,326	0,989	0,621
24	-0,807	-0,493	-0,450	-0,384	0,778	1,042	0,642	0,330
25	-0,655	-0,630	-0,394	-0,580	0,704	1,473	0,880	0,510
26	-0,785	-0,590	0,107	-0,843	0,647	1,146	1,422	1,002
27	-1,016	-0,546	-0,458	-0,941	0,956	1,256	1,022	0,181
29	-0,664	-0,441	-0,217	-0,304	1,125	1,469	0,754	0,436
30	-0,595	-0,546	-0,151	-0,603	0,878	0,538	1,083	0,588
31	-1,009	-0,865	0,073	-0,795	1,132	0,873	0,817	0,744
32	-0,802	-0,833	0,190	-0,455	0,513	0,944	0,813	0,565
33	-0,589	-0,457	-0,088	-0,296	0,771	0,909	0,778	0,913
34	-0,385	-0,552	-0,298	-0,528	0,606	0,702	0,660	0,499
35	-0,566	-0,491	-0,688	-0,930	1,215	1,150	1,144	1,148
36	-0,573	-0,595	-0,390	-0,090	0,729	0,813	0,818	0,626
37	-1,122	-0,447	-0,270	-0,127	0,911	1,064	0,803	1,477
38	-1,099	-0,695	-0,529	-0,357	0,963	1,360	0,846	0,592
39	-0,453	-0,743	0,118	-0,493	1,045	1,624	1,578	1,130
40	-0,680	-1,396	-0,136	-0,580	1,260	1,422	1,548	0,905
41	-0,410	-0,677	0,230	-0,233	1,010	1,217	0,768	0,886

Anhang

Tabelle 31: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von IL-10 RA, IL-13RA1, IL-1R1 und R2; A=Ruhe, C=MZP 45'post

Nr	IL10RA_A	IL10RA_C	IL13RA1_A	IL13RA1_C	IL1R1_A	IL1R1_C	IL1R2_A	IL1R2_C
1	0,459	0,068	-0,056	0,099	-0,385	-0,423	1,180	0,586
4	0,416	0,476	-0,237	-0,319	-0,148	-0,185	1,618	1,802
6	0,736	0,671	0,016	-0,194	-0,220	-0,193	1,679	1,410
7	0,197	0,300	-0,268	-0,289	-0,198	-0,123	0,915	1,869
8	0,268	0,210	-0,391	-0,477	-0,384	-0,109	1,073	2,029
9	0,322	0,072	-0,387	-0,461	-0,079	0,146	2,524	2,181
10	0,347	0,183	-0,445	-0,294	-0,235	0,180	2,621	2,482
11	0,071	-0,070	-0,234	-0,401	-0,262	0,007	2,481	1,909
12	0,492	0,056	-0,183	-0,397	-0,348	0,307	2,000	2,410
13	0,364	0,199	-0,014	-0,256	-0,232	-0,010	2,263	3,000
14	0,491	-0,297	-0,355	-0,396	-0,169	0,301	2,670	3,755
15	0,213	0,151	-0,352	-0,422	-0,347	0,185	2,197	3,105
16	0,467	0,334	-0,469	-0,741	-0,027	-0,204	2,077	2,635
17	0,444	0,214	-0,369	-0,047	0,203	0,214	2,085	1,825
18	0,762	-0,116	0,189	-0,701	0,054	0,065	2,301	2,813
19	0,288	0,139	-0,475	-0,076	-0,473	0,063	2,390	3,189
20	0,346	0,177	-0,608	-0,484	-0,193	-0,223	2,427	2,612
21	0,111	0,162	-0,546	-0,232	-0,328	-0,047	2,020	2,732
22	0,364	0,073	-0,602	-0,574	0,075	0,215	2,778	3,469
23	0,261	0,311	-0,533	-0,421	-0,118	0,269	2,173	2,725
24	0,578	0,030	-0,260	-0,462	-0,178	-0,148	2,606	2,639
25	0,112	0,393	-0,413	0,073	-0,272	-0,034	2,518	3,202
26	0,433	0,416	-0,158	-0,258	-0,397	0,011	3,331	3,359
27	0,037	-0,112	-0,589	-0,942	-0,120	-0,176	2,736	2,710
29	0,203	0,364	-0,259	-0,616	-0,126	0,063	2,064	3,062
30	-0,010	0,741	-0,510	-0,471	-0,450	-0,341	1,275	2,183
31	0,323	-0,009	-0,128	-0,326	-0,227	0,021	2,116	3,313
32	0,385	0,043	-0,532	-0,612	-0,015	-0,216	2,108	2,553
33	0,417	0,285	0,123	-0,111	0,006	-0,001	2,319	3,299
34	0,014	-0,003	-0,495	-0,735	-0,474	-0,496	1,800	1,703
35	0,344	0,041	-0,426	-0,706	-0,095	-0,014	2,507	2,420
36	0,268	0,305	-0,578	-0,628	0,004	-0,232	1,727	1,862
37	0,643	0,654	-0,059	-0,034	-0,362	0,170	2,273	2,510
38	0,154	-0,086	-0,255	-0,247	-0,378	0,228	2,367	2,126
39	0,334	0,163	-0,454	-0,598	0,193	0,139	2,194	3,326
40	0,251	0,157	-0,232	-0,655	-0,154	0,171	2,602	2,341
41	0,373	0,091	-0,263	-0,511	-0,230	0,250	1,126	2,249

Anhang

Tabelle 32: Einzelwerte der Genexpressionen (ratio) von IL2RA und RG, IL-8 und TNF; A=Ruhe, C=MZP 45'post

Nr	IL2RA_A	IL2RA_C	IL2RG_A	IL2RG_C	IL8_A	IL8_C	TNF_A	TNF_C
1	-0,290	0,004	1,164	0,602	-1,570	-0,517	-0,041	0,464
4	0,517	-0,022	1,231	1,263	-1,809	-0,932	-0,232	-0,122
6	0,468	-0,373	1,532	1,340	-2,189	-2,423	-0,036	-0,155
7	-0,041	0,193	0,829	0,303	-1,639	-1,915	-0,132	-0,105
8	0,251	0,041	0,867	0,762	-1,732	-2,286	-0,180	-0,332
9	0,502	0,294	1,016	0,843	-1,828	-1,226	-0,225	0,255
10	0,445	-0,026	1,279	0,850	-2,087	-1,461	-0,147	0,106
11	0,547	-0,051	1,207	0,767	-1,721	-1,784	-0,169	-0,293
12		0,075	0,930	0,649	-1,870	-0,879	-0,326	-0,144
13	0,319	-0,273	1,006	0,895	-2,166	-1,264	-0,229	-0,015
14	0,372	-0,017	1,036	0,830	-2,496	-0,772	-0,531	-0,173
15		0,529	1,036	1,284	-1,952	-1,777	-0,241	-0,293
16	-0,170	0,312	1,181	0,986	-1,803	-1,488	-0,223	-0,220
17	-0,206	0,503	1,290	1,223	-2,355	-2,294	-0,828	-0,908
18	-0,060	0,166	1,370	1,064	-2,012	-1,615	-0,019	-0,010
19		0,137	1,091	0,901	-2,205	-1,567	-0,247	-0,295
20	0,658	0,513	0,947	0,920	-1,937	-2,138	-0,543	-0,247
21	0,293	0,525	0,898	0,796	-2,318	-1,272	-0,314	-0,165
22	0,933	0,475	1,155	0,784	-2,610	-1,790	-0,462	-0,359
23	0,643	0,083	1,172	1,301	-2,287	-1,994	-0,616	-0,236
24	-0,125	-0,452	0,986	0,804	-1,985	-2,050	-0,365	-0,179
25	0,170	0,401	1,036	1,099	-1,920	-1,071	-0,303	-0,059
26	0,410	-0,153	1,322	1,137	-2,224	-2,133	-0,528	-0,307
27	0,670	0,002	1,125	-0,055	-2,820	-2,502	-0,421	-0,586
29	0,579	0,035	0,989	0,952	-2,407	-1,935	-0,118	0,113
30	0,054	0,110	0,897	0,770	-1,788	-1,976	-0,080	-0,096
31	0,219	0,102	0,895	0,472	-2,747	-1,707	-0,279	-0,282
32	0,320	0,075	0,981	0,620	-2,424	-2,267	-0,237	-0,040
33		-0,230	1,051	0,853	-1,918	-1,868	-0,081	-0,113
34	0,220	0,193	1,240	0,548	-1,592	-1,533	-0,342	-0,344
35	0,601	0,250	1,131	0,709	-1,641	-1,561	-0,789	-0,314
36	0,174	0,043	0,858	0,703	-2,077	-1,881	-0,924	-0,790
37	0,514	-0,664	0,736	1,712	-2,165	-1,375	-0,586	-0,147
38	0,792	0,099	0,601	0,624	-2,308	-2,013	-0,375	-0,260
39	0,273	0,450	1,186	0,852	-2,217	-1,014	-0,284	-0,246
40	0,327	0,038	0,795	0,843	-1,964	-1,867	-0,238	-0,155
41	-0,143	-0,146	0,687	0,523	-1,783	-1,302	-0,062	0,117

Abbildung 51: eingesetzter Fragebogen aus Li (1998)

	Ja	Nein
1. Hatten Sie schon einmal: a) Heuschnupfen oder allergische Rhinitis (Nasenschleimhautentzündung bzw. verstopfte Nase, auch wenn du nicht erkältet warst) b) Asthma c) Belastungsinduziertes Asthma		
2. Hatten Sie schon jemals folgende Symptome: a) Brustenge b) Husten c) Keuchen/ Schnaufen d) verlängerte Kurzatmigkeit e) Hautausschlag		
3. Wenn Sie sich belasten, haben Sie dann öfters oder vereinzelt: a) Brustenge b) Husten c) Keuchen / Schnaufen (Giemen/ Brummen) d) verlängerte Kurzatmigkeit e) Hautausschlag f) Brustschmerzen g) Magenschmerzen, Übelkeit, Erbrechen h) Wenn ja, mussten Sie dann die Belastung aufgrund eines dieser Symptome abbrechen.		
4. Verursachte schon einmal bei Ihnen kalte Luft, Zigarettenrauch, Gerüche von Gemälden oder Parfums, Staub oder Schimmel bei Ihnen Brustenge, Husten oder Keuchen bzw. Giemen oder Brummen?		
5. Verursachte bei Ihnen Joggen schon einmal Brustenge oder Husten oder Keuchen oder andauernde Kurzatmigkeit?		
6. Haben Sie häufiger starken Schnupfen (mit verstopfter Nase, Niesen und Kopfschmerzen), der auch zu Symptomen in der Brust führt?		
7. Wurde bei Ihnen schon mal eine Nasennebenhöhlenentzündung diagnostiziert?		
8. Hat jemand in Ihrer Familie Asthma, Heuschnupfen oder andere Allergien? Wenn ja, wer und beschreiben Sie kurz die Krankheit!		
9. Leiden Sie unter juckenden Augen? Wenn ja, in welchen Monaten?		

		Ja	Nein
10.	Mussten Sie sich schon mal wegen Brustschmerzen, oder Husten oder Keuchen oder andauernder Kurzatmigkeit krankschreiben lassen?		
11.	Haben Sie schon mal Medikamente gegen Asthma oder andere Allergien eingenommen? Wenn ja, welche:		
12.	Haben Sie mal geraucht? Wenn ja, sind Sie derzeit Raucher?		

Anhang

Tabelle 33: Ergebnisse des Fragebogens der Fragen 1-3 (1=ja, 0=nein; UT=Untrainiert, T=Trainiert)

Prbnr.	T/ UT	1a	1b	1c	2a	2b	2c	2d	2e	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h
1	UT	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
2	UT	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
3	UT	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	UT	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
5	UT	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	UT	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
7	UT	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	UT																
9	UT	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	UT	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	UT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	UT	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13	UT	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	UT	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	UT	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	UT	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
17	UT	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
18	UT																
19	UT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	UT																
21	T	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
22	T	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	T	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	T	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	T	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
26	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	T	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
28	T	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	T	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30	T	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
31	T	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	T	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
33	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	T	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
36	T	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
37	T	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
38	T	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	T																
40	T																
41	T	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

Anhang

Tabelle 34: Ergebnisse des Fragebogens der Fragen 4-12 (1=ja, 0=nein; UT=Untrainiert, T=Trainiert, HS=Heuschnupfen)

Prbnr.	T/ UT	4	5	6	7	8	8a	9	9a	10	11	11a	12a	12b
1	UT	1	1	0	1	0		0		0	0		0	0
2	UT	0	1	0	0	0		0		0	0		0	0
3	UT	0	0	0	0	1	Schwester	1	April/Mai	0	1	HS	1	0
4	UT	1	0	0	0	0		0		0	0		0	0
5	UT	1	0	0	0	1		0		0	0		0	0
6	UT	1	0	0	0	1	Vater	1	Februar-August	1	1	HS	0	0
7	UT	0	0	0	0	0		0		0	0		0	0
8	UT													
9	UT	1	0	0	0	0		1	Juni/Juli	0	1		0	0
10	UT	1	0	0	0	1	Vater	1	März-Sept	0	1	HS	0	0
11	UT	1	0	0	0	1	Opa	0		0	1		0	0
12	UT	0	0	0		0		1	Mai-Juli	0	1	HS	0	0
13	UT	1	0	0	0	1	Mutter	1	April/Mai	0	1	HS	0	0
14	UT	1	1	0	1	0		1	April/Mai	1	1	HS	0	0
15	UT	0	0	0	1	0		0		0	0		0	0
16	UT	1	0	1	0	1	Tante	0		0	1	HS	0	0
17	UT	0	0	0	0	1	Mutter	0		0	0		0	0
18	UT													
19	UT	1	0	0	0			0		1	0		0	0
20	UT													
21	T	1	0	0	1	1	Bruder	0		0	0		1	0
22	T	1	1	0	0	0		0		0	0		0	0
23	T	0	0	0	0	0		0		0	0		0	0
24	T	1	0	0	0	1	Vater	0		0	0		0	0
25	T	1	1	0	1	1	Mutter	0		0	0		0	0
26	T	0	0	0	0	0		0		0	0		0	0
27	T	0	0	0	0	1	Vater	0		0	0		0	0
28	T	1	0	0	1	0		0		0	0		0	0
29	T	0	0	0	1	0		0		0	0		0	0
30	T	1	0	0	0	1	Mutter	0		0	0		0	0
31	T	0	0	0	0	0		0		0	0		0	0
32	T	1	0	0	0	0		0		0	0		0	0
33	T	1	0	0	0	0		0		0	0		1	0
34	T	0	0	0	0	0		0		0	0		0	0
35	T	0	0	0	0	1	Vater	0		0	1	HS	0	0
36	T	0	0	0	0	1	Mutter	0		0	0		1	0
37	T	1	0	0	0	1	Vater	1	Juni/Juli	0	0		1	0
38	T	0	0	0	1	0		0		0	0		0	0
39	T													
40	T													
41	T	1	1	0	1	0		0		0	0		0	0

Ehrenwörtliche Erklärung

Mir, Antje Peuckert, geboren am 03.05.1978 in Weimar, ist die Promotionsordnung der Friedrich – Schiller Universität Jena bekannt und ich erkenne selbige an.

Hiermit versichere ich, die hier vorliegende Dissertation selbständig angefertigt zu haben. Für die Bearbeitung wurde keinerlei Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden nach bestem Gewissen in der Arbeit angegeben.

Für die Auswahl und Auswertung der Blutuntersuchungen waren Labormitarbeiter des Lehrstuhls für Sportmedizin der FSU Jena, sowie für die Genexpressionsanalysen die Mitarbeiter der SIRS Lab GmbH Jena verantwortlich. Die Gesundheits- und Belastungsuntersuchungen erfolgten durch Frau Dr. med. B. Dohrn und Frau Dr. med. B. Estel vom Klinikum der FSU Jena. Die Betreuung während der experimentellen Phase und der Manuskripterstellung erfolgte durch meinen Doktorvater PD Dr. Dr. Hilberg.

Darüber hinaus wurden weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten an Dritte vergeben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Weder die gleiche noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung wurde bei einer anderen Hochschule bzw. Fakultät als Dissertation eingereicht.

Alle hier gemachten Angaben wurden nach besten Wissen und Gewissen gemacht. Ich versichere die reine Wahrheit gesagt zu haben und nichts verschwiegen zu haben.

Danksagungen

Vielen Dank

- PD Dr. Dr. Thomas Hilberg , für die exzellente Betreuung und die vielen Hilfestellungen bei der Bearbeitung des Themas. Mein Dank gilt auch dem Bundesinstitut für Sportwissenschaften für die finanzielle Unterstützung der Studie.
- Prof. Holger Gabriel für die Gewährung der Forschungsfreiräume und die freundliche Unterstützung
- an unseren Kooperationspartner, die SIRS Lab GmbH, insbesondere an PD Dr. Stefan Russwurm, Dr. Karen Felsmann und die Labormitarbeiter für ihre exzellente und schnelle Aufarbeitung der Genexpressionsdaten, für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die hilfreichen kritischen Diskussionen.
- „meinen“ beiden Ärztinnen Dr. Barbara Dohrn und Dr. Barbara Estel, ohne deren unermüdliches Schuften und deren Humor die Studie nicht so schnell und termingerecht abgelaufen wäre. Ich danke euch für all die schönen aber auch anstrengenden Stunden!
- Birgit Dorschner, Kathleen Menzel, Hans-Joseph Müller, meinen Praktikanten und Hilfskräften, Sebastian Birke und Steffi Krummrich, für eure engagierte und produktive Mitarbeit im Labor und bei der Betreuung der Sportler während der Ergometrie.
- allen Studienteilnehmern, vielen Dank für eure Bereitschaft, euer Engagement und eure Geduld. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht!
- meinen lieben Kollegen am Lehrstuhl, die ihr meine Arbeit bereichert habt. Besonderer Dank an meine Mit-Promoventen Ina Schulz, Anne Leschinski, Berit Wanjek, Doreen Gläser und Fabian Saalbach für die vielen guten Gespräche, eure Unterstützung und das ich immer auf euch zählen konnte.
- allen meinen Freunden und ganz besonders Julia Henning, die beste Freundin und Mitbewohnerin die man sich wünschen kann!

Mein tiefster Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich stets unterstützt und gefördert haben! Danke für alles!

Lebenslauf

Antje Peuckert, M.A.

07743 Jena, Lutherstr. 118

Biographische Daten

Geboren am: 03.05.1978 in Weimar

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutschland

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1984 – 1990 Gesamtschule „H. Rau“ Weimar

1990 – 1991 Gesamtschule „L. Cranach“ Weimar

1991 – 1996 „Sophien“ - Gymnasium Weimar, Abitur

1996 – 2001 Studium an der Friedrich Schiller Universität Jena
zur Erlangung des akademischen Grades MAGISTER ARTIUM (M.A.)

- Sportwissenschaft
- Psychologie
- Erziehungswissenschaft

01/2001 – 07/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Leistungsdiagnostik und angewandte Forschung Jena (ILDAF GmbH)

08/2003 – 11/2006 Promotionsstudentin an der Fakultät für Sozial- und Verhaltenswissenschaften am Lehrstuhl für Sportmedizin zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde (Dr. phil.)

09/2003 – 08/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Sportmedizin

10/2005 – 12/2005 wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Sportmedizin

Praktika und zusätzliche Qualifikationen

02/2000	8-wöchiges Praktikum im MSG- Hannover (Zentrum für Sportmedizin und Leistungsdiagnostik)
07 – 10/2000	Praktikum im Labor der Sport- und Arbeitsphysiologie der Medizinischen Hochschule in Hannover (MHH) (Betreuer: Prof. N. Maassen)
Seit 10/ 2000	Fitnesstrainerin im „Planet of Motion“ in Weimar
Seit 2002	Referentin für den LSB Thüringen
10/2005	SIRS-Lab GmbH Jena (Labor-Praktikum)

Veröffentlichungen

CHOUCHAKOV, V.; PEUCKERT, A.; STRUCKMANN, F.; MAASSEN, N.:
EMG and [K⁺] during isometric exercise of different intensity.
6th Annual Congress of the European College of Sport Science – 15th Congress of the German Society of Sport Science, Cologne, 2001

Besondere Kenntnisse

Sprachen:	Englisch (sicher in Wort und Schrift) Spanisch (Grundkenntnisse) Russisch (Grundkenntnisse)
EDV:	Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint, Outlook, Access), Lotus, SPSS, Sigma Plot, Endnote, Adobe Photoshop
Sport:	A-Trainer Lizenz Fitness C-Trainer Lizenz Tennis Nordic-Walking-Instructor

Ort, Datum

Unterschrift